

**Cholinesterasen in Liquor und Serum –
Untersuchungen zur Pathogenese von
Krankheitsbildern mit degenerativen
Veränderungen der lumbalen Wirbelsäule**

Habilitationsschrift

vorgelegt November 2002

der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dr. med. Wolfram H. Kluge

aus Jena

Gutachter

1. Prof.Dr.med.R.A. Venbrocks

2. Prof.Dr.med.O.W.Witte

3. Prof.Dr.V.Ewerbeck

Erteilung der Lehrbefähigung am

Inhaltsverzeichnis

1.	Grundlagen	1
1.1	Motivation	1
1.2	Untersuchungstechniken	6
1.3	Analyse des Liquor cerebrospinalis - Problem-orientierte Erwägungen	8
1.4	Blut-Hirn/Rückenmark-Liquor-Schrankenfunktionen	9
1.5	Parameterauswahl zu Untersuchungen der Pathogenese von Krankheitsbildern, assoziiert mit degenerativen Veränderungen der lumbalen Wirbelsäule	12
1.5.1	Parameter zur Charakterisierung der Blut-Liquor-Schrankenfunktion	12
1.5.2	Parameter zur Charakterisierung funktioneller Aktivität nervaler Gewebe	13
1.5.3	Cholinesterasen als Parameter zur Charakterisierung funktioneller Aktivität nervaler Gewebe bzw. der Blut-Liquor-Schrankenfunktion	15
2.	Ziel und Konzept	31
3.	Methoden	33
3.1	Parameter, Analyseverfahren	33
3.1.1	AChE und BChE	33
3.1.2	Gesamteiweißkonzentration im Liquor, Albuminquotient Liquor/Serum	37
3.1.3	Weitere Parameter	38
3.1.4	Testsubstanzen	38
3.1.5	Entnahmebedingungen der Liquor- und Serumproben	38
3.2	Untersuchte Personen	39
3.2.1	Kontrollgruppen	39
3.2.2	Patientengruppen	41
3.3	In vitro-Testung zum Einfluß von Medikamenten auf die Testsysteme zur Bestimmung der Cholinesteraseaktivitäten	42
3.4	Statistische Analyse	43
3.5	Ethik	43
4.	Acetylcholinesteraseaktivität im lumbalen und ventrikulären Liquor	44
4.1	Patienten, Parameter, Material und Methoden	44
4.2	Ergebnisse der Referenzwertbestimmung für AChE-Aktivität im lumbalen Liquor	45
4.3	Ergebnisse der Untersuchungen zur AChE-Aktivität im ventrikulären Liquor	46
4.4	In vitro-Hemmung der AChE-Aktivität durch ausgewählte Medikamente	49
4.5	Diskussion der Ergebnisse	50
4.6	Zusammenfassung	55

5.	Butyrylcholinesteraseaktivität im lumbalen und ventrikulären Liquor	55
5.1	Patienten, Parameter, Material und Methoden	56
5.2	Ergebnisse der Referenzwertbestimmung für BChE-Aktivität im lumbalen Liquor	56
5.3	Ergebnisse der Untersuchungen zur BChE-Aktivität im ventrikulären Liquor	58
5.4	In vitro-Hemmung der BChE-Aktivität durch ausgewählte Medikamente	61
5.5	Diskussion der Ergebnisse	62
5.6	Zusammenfassung	67
6.	Cholinesteraseaktivitäten und Blut-Liquor-Schrankenfunktion im lumbalen Liquor bei degenerativen Veränderungen der Lendenwirbelsäule	68
6.1	Patienten, Parameter, Material und Methoden	68
6.1.1	Untersuchte Personen	68
6.1.2	Parameter und Tests	69
6.2	Ergebnisse	69
6.2.1	Vergleich der Kontrollgruppe mit der gesamten Patientengruppe	69
6.2.2	Vergleich der Patienten-Untergruppen mit der Kontrollgruppe und untereinander	75
6.3	Diskussion der Ergebnisse	79
6.4	Zusammenfassung	83
7.	Einfluß von Bupivacain auf Cholinesteraseaktivitäten, Gesamtprotein und Albuminquotient	85
7.1	Parameter, Material, Methoden und Patienten	86
7.1.1	Parameter und Tests	86
7.1.2	Patientengruppen	86
7.2	Ergebnisse	88
7.3	Diskussion	96
7.4	Zusammenfassung	102
8.	Neue Aspekte zu Pathogenese und Therapie von Krankheitsbildern assoziiert mit degenerativen Veränderungen der lumbalen Wirbelsäule	104
9.	Zusammenfassung der gesamten Arbeit	117
	Anhang 1	120
	Anhang 2	130
	Abkürzungen	141
	Literatur	
	Lebenslauf, Publikationsliste	

1. Grundlagen

1.1 Motivation

Rückenschmerzen haben in den Industrienationen dramatische Ausmaße angenommen. Eine Übersicht über bevölkerungsepidemiologische Studien zeigt, daß 40 % der Erwachsenen über zum Zeitpunkt der Befragung vorliegende Rückenschmerzen berichten [227]. Über 70% aller Erwachsenen leiden mindestens einmal im Leben an Rückenschmerz, 7% haben einmal pro Jahr akute Rückenschmerzen, 3 - 7% leiden unter chronischem Rückenschmerz [47,49]. Nach van Schayck und Weiller [260] ist die auslösende Ursache von Rückenschmerzen bei 2/3 aller untersuchten Fälle letztlich unklar. Offensichtlich stellen degenerative Wirbelsäulenerkrankungen jedoch die bedeutendste somatische Ursache von Rückenschmerzen dar [14]. Detaillierte differentialdiagnostische Statistiken über den Anteil der verschleißbedingten Ursachen für den Rückenschmerz sind in den letzten Jahrzehnten nicht erarbeitet worden. Es ist jedoch anzunehmen, daß die überwiegende Mehrzahl der Patienten unter degenerativen Veränderungen der Wirbelsäule leidet, da andere Ursachen wie traumatische Schäden des Rückenmarkes mit einer Inzidenz von 1/20000 [145], oder Osteomyelitis der Wirbelkörper mit einer Inzidenz von 1/250000 [75] eher eine untergeordnete Rolle in der Epidemiologie des Rückenschmerzes spielen. Degenerative Wirbelsäulenschäden verursachen immense Kosten durch Arbeitsausfall, Diagnostik, Therapie und finanzielle Kompensation. Bereits für 1986 bezifferten Versicherungsgesellschaften in den USA die im Rahmen des Problems Rückenschmerz gezahlten Kompensationen mit jährlich \$ 11,1 Milliarden [270]. Die Kosten für medizinische Behandlungen belaufen sich auf etwa 1/3 der Gesamtausgaben und lagen somit 1986 bei ca. \$ 4,9 Milliarden für die USA.

17% aller Neuzugänge der Berufs- und Erwerbsunfähigkeitsrenten in Deutschland basieren gegenwärtig auf Rückenschmerz [14]. Während die Inzidenz des Rückenschmerzes unter der Bevölkerung moderner Industriestaaten in den vergangenen Jahren annähernd gleich zu bleiben scheint, nehmen die Ausgaben für Verlust an Arbeitszeit, für Therapie und Kompensationen beständig zu [93].

Degenerative Veränderungen der lumbalen Wirbelsäule stellen aus funktioneller Sicht eine Einheit nicht voneinander zu trennender pathologischer Erscheinungen dar, die auf den Alterungsprozeß der betroffenen Strukturen zurückzuführen sind. Die klinischen Erscheinungsbilder werden durch ineinander übergehende Phasen mechanischer Alterationen (Dysfunktion, Instabilität, Stabilisierung) bestimmt [93].

Aus diagnostischen (bildgebenden) Erwägungen wird eine Einteilung in Fassetgelenkarthrosen, Bandscheibenvorfälle und knöcherne Enge des Spinalkanals vorgenommen. Klinische und neurophysiologische Diagnostik ermöglichen eine weitere Einteilung in Schmerzsyndrome (lokal, fortgeleitet, oder radikulär) mit oder ohne neurologische Ausfallserscheinungen (sensibel, motorisch).

Eine umfassende Erklärung der Pathogenese des Schmerzes und neuronaler Schädigungen auf geweblicher und zellulärer Ebene konnte bisher nicht gefunden werden [269]. Die Einengung der Strukturen des Wirbelkanals bzw. Kompression der Nervenwurzeln stellt *eine* der bekannten ätiologischen Grundlagen des Schmerzes und der Funktionseinschränkung dar. Akute und chronische Rücken- und Beinschmerzen im Rahmen degenerativer Wirbelsäulenerkrankungen können als *Nozizeptorschmerzen* durch mechanische Bedrängung und entzündliche Irritation an der Nervenwurzel, in den Wirbelgelenkkapseln und Bandstrukturen auftreten. Diese führen zu reflektorischen, ebenfalls potentiell schmerzauslösenden Reaktionen der Muskulatur [174,200]. Bei *pseudoradikulären Schmerzen* im Rahmen von Gelenkblockierungen werden häufig übertragene Schmerzen beobachtet. Läsionen des Myelons, mechanische und entzündliche Nervenwurzelschädigungen und periphere Nervenläsionen führen zum *neuropathischen Schmerz* einschließlich radikulärer Schmerzsyndrome.

Die *Therapie* ist von operativer Seite auf die Beseitigung von Instabilität und Kompression ausgerichtet und bei fundierter Indikation zumindest initial sehr erfolgreich. Der größte Teil der degenerativen Wirbelsäulenschäden rechtfertigt jedoch nicht den operativen Eingriff und wird konservativ behandelt.

Langzeitstudien von Hakelius [105] und Weber [268] zeigten, daß die operative der konservativen Therapie bei nachgewiesenen Bandscheibenschäden nur im

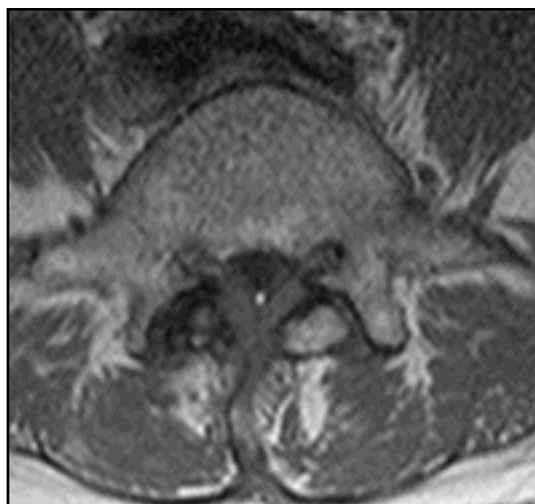
ersten Jahr nach dem Eingriff überlegen ist. Nach 4-5 Jahren ließ sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Behandlungserfolges mehr nachweisen. Die konservative Therapie ist, ohne ihren Wert mindern zu wollen, empirisch orientiert. Dem behandelnden Arzt fällt es oft nicht leicht herauszufinden, welche der therapeutischen Maßnahmen zu positivem Behandlungsergebnis bei einem akuten Bandscheibenvorfall führen. Entlastung mechanischer Kompression der Dura bzw. nervaler Strukturen durch medikamentöse (analgetisch-antientzündlich) und physiotherapeutische Behandlung wird zwar angenommen, läßt sich aber durch bildgebende oder elektrophysiologische Verfahren nicht beweisen (Abb. 1).

Abb. 1. MRT. Medialer Bandscheibenvorfall (L4/5) mit Kontakt und Verlagerung der Dura und nervaler Strukturen. Die Wirbelgelenke zeigen nur leichte arthrotische Veränderungen. Nach konservativer Therapie bestand zum Zeitpunkt dieser Kontrollaufnahme Beschwerdefreiheit. Der MRT-Befund entspricht dem der Voraufnahme bei stationärer Einweisung wegen akuter Lumboischialgie beidseits ohne neurologische Ausfallserscheinungen.



Chronischer lokaler lumbaler Schmerz, Lumboischialgie oder Wurzelreizsyndrom, assoziiert mit Fasettengelenkarthrose oder engem knöchernen Spinalkanal (Abb. 2), können ebenfalls erfolgreich durch konservative Maßnahmen therapiert werden.

Abb. 2. MRT. Enger knöcherner Spinalkanal der Etage S1, ausgeprägte Fasettengelenkarthrose. Die Dura wird durch hypertrophierte ligamentäre Strukturen und knöcherne Anbauten um die Wirbelgelenke verdrängt. Konservative Behandlung führte zu anhaltender Beschwerdefreiheit hinsichtlich der primär angegebenen chronischen Lumboischialgie beidseits.



Der Behandlungserfolg ist offensichtlich nicht durch verminderte knöcherne bzw. ligamentäre Einengung zu erklären. Der These mechanisch ausgelöster Kompression folgend, bewirken systemische antientzündlich-medikamentöse Therapie wie auch physiotherapeutische Anwendungen ein Abschwellen der betroffenen meningealen, nervalen und bindegewebigen Strukturen im Bereich der Läsion. Eine äquivalente Erklärung gilt für den positiven Effekt konservativer Behandlung bei dem sogenannte Post-Diskektomie-Syndrom, bei dem sich in vielen Fällen weder durch bildgebende noch durch spezielle neurologische Diagnostik ein die chronische Schmerzsymptomatik begründendes pathologisches Substrat finden läßt.

Epidurale Umflutungen der durch degenerative Veränderungen betroffenen Region mit Lokalanästhetika haben einen sofortigen antinozizeptiven Effekt durch Unterbrechung der Schmerzleitung. Die gleichzeitige Injektion von Depotsteroiden kann Schmerzfreiheit über einen längeren Zeitraum bewirken. Bandscheibenvorwölbungen oder knöcherne Enge werden durch die lokale Applikation von schmerzstillenden/antientzündlichen Medikamenten mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit nicht kausal beeinflusst. Die lokale Infiltrationstherapie ist somit *symptomatisch*. Für die über die initiale Anästhesie

hinausgehende Wirkung lokal applizierter Medikamente im Bereich der Wirbelsäule konnte bisher keine überzeugende Erklärung gefunden werden.

Wechselnde Therapieerfolge legen die Vermutung nahe, daß mechanische Entlastung nicht ausschließlich als Erklärung für das gebesserte Schmerzbild gelten kann. *Funktionelle Veränderungen betroffener Gewebe auf physiologisch-biochemischer Ebene sind anzunehmen.*

Eigene (unveröffentlichte) Untersuchungen an magnetresonanztomographischen Querschnittbildern haben gezeigt, daß eine Läsion der Integrität von Bandscheiben ohne sichtbare Kompression der Dura oder neuronaler Strukturen zu chronisch aktivitätsminderndem lokalem Rückenschmerz im Bereich der Läsion führen kann. Der Liquorraum erscheint nicht eingengt und eine freie Liquorzirkulation kann angenommen werden (Abb. 3). Ähnliche magnetresonanztomographische Bilder finden sich jedoch als Zufallsbefund in nicht symptomatischen Arealen der Wirbelsäule.

Abb. 3. MRT. Degenerativ veränderte Bandscheibe L4/5 mit Protrusion. Kontakt zur Dura ohne maßgebliche Verdrängung der neuronalen Strukturen. Lumbale Schmerzsymptomatik seit mehreren Monaten.



Die Frage nach der schmerzauslösenden Pathologie läßt sich offenbar nur über einen neuen methodischen Zugang zu den lokal betroffenen Geweben bzw. zu ihren funktionellen Eigenschaften klären.

1.2 Untersuchungstechniken

Eine bioptische Entnahme der durch degenerative Wirbelsäulenerkrankungen geschädigten meningealen und neuronalen Gewebe ist beim Menschen verständlicherweise nicht durchführbar. Studien zur Ätiopathogenese basierten deshalb vorrangig auf den Ergebnissen histologischer Untersuchungen der exzidierten Bandscheiben, Wirbelgelenke und ligamentären Strukturen bei dekomprimierenden Wirbelsäuleneingriffen, sowie auf post mortem Analysen. Degeneration der Fasettengelenke kann bereits bei jungen Patienten auftreten. Miller et al. [182] fanden anhand histologischer Untersuchungen, daß die Diskusdegeneration mit dem Alter zunimmt, Männer häufiger als Frauen erkranken und daß die Etagen L4/5 sowie L3/4 am häufigsten betroffen sind. Urban und McMullin [258] konnten belegen, daß die Hydratation der Bandscheiben mit zunehmendem Alter abnimmt. Neumann et al. [191] sahen einen direkten Zusammenhang zwischen den Eigenschaften spinaler ligamentärer Strukturen und dem Mineralgehalt der Wirbelknochen.

Eine indirekte Untersuchungsmethode ergibt sich durch die im Rahmen der Diagnostik vorgenommenen bildgebenden Verfahren. Urovitz und Fornasier [259] zeigten beispielsweise an CT-Untersuchungen nach Myelographie eine makroskopisch sichtbare Schwellung von Cauda equina und Nervenwurzeln als Folge von Bandscheibenschäden - nach Diskektomie kehrten die Nervenwurzeln zu ihrer normalen Form zurück.

Die Computertomographie hat die Möglichkeiten der Grundlagenforschung bei Wirbelsäulenerkrankungen revolutioniert. Knöcherne Veränderungen werden im Detail durch Schnittdarstellungen und dreidimensionale Rekonstruktionen sichtbar. Zur präzisen Analyse von Weichteilen ist allerdings die Applikation von Kontrastmittel erforderlich. Auch die nicht unbedeutende Strahlendosis limitiert selbst bei neuesten Scannern deren vorbehaltlose Anwendung in Klinik und Forschung.

Die hoch auflösenden Bilder magnetresonanztomographischer Untersuchungen ermöglichen eine (nach gegenwärtigen Erkenntnissen nebenwirkungsarme) anderen Darstellungsformen überlegene Weichteildiagnostik bei degenerativen Bandscheiben- und Wirbelgelenkschäden [247]. MRT-Untersuchungen belegten, daß lumbale Bandscheibendegenerationen nach dem 50. Lebensjahr generell

nachweisbar sind und daß vor Beendigung des 60. Lebensjahres 20% der asymptomatischen Probanden mindestens eine degenerativ bedingte lumbale Nucleus pulposus Hernie besitzen [33]. Die Studien weisen auf die Schwierigkeiten bei der Zuordnung von bildgebenden Darstellungen im Zusammenhang mit Rückenproblemen hin: Selbst qualitativ hochwertige MRTs erlauben keine absolut sicheren differentialdiagnostischen Rückschlüsse auf die zugrunde liegende Ätiologie der schmerzhaften spinalen Funktionsminderung.

Untersuchungsverfahren, deren vordergründiges Ziel der Ausschluß nicht degenerativ bedingter spinaler Erkrankungen ist, werden in der ätiologisch-pathogenetisch orientierten Forschung verwendet (an entsprechender Stelle wird auf relevante Studienergebnisse eingegangen). Hierzu zählt die Elektromyographie, welche der Differenzierung und Verlaufsbeobachtung von Läsionen des peripheren Nervensystems anhand muskulärer Aktivität dient. Periphere Neuropathie und neurologische Schäden ober- oder unterhalb der primär interessierenden Wirbelsäulenregion können identifiziert werden. Somatosensibel evozierte Potentiale werden zur Höhenlokalisierung von Rückenmarksprozessen verwendet. Die Knochenszintigraphie dient der Untersuchung von neoplastischen, infektiösen, traumatischen und rheumatischen Wirbelsäulenerkrankungen.

Keine Untersuchungsmethode ist perfekt. Moderne technische Verfahren stellen eine Vielzahl von pathologischen Veränderungen dar. *Die entscheidende Frage ist jedoch, welche dieser Veränderungen für die Symptome des Patienten ätiologisch verantwortlich zu machen sind und durch welche pathogenetischen Mechanismen die Symptomatik ausgelöst wird. Diese Problematik kann nicht nur durch qualitative Verbesserung der erwähnten Untersuchungstechniken geklärt werden, sondern erfordert zusätzliche andere Untersuchungsansätze.* Ein solcher zusätzlicher Ansatz unter Nutzung relevanter Parameter des Liquor cerebrospinalis bildet den inhaltlichen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit und wird im Folgenden abgeleitet.

Da der histologischen Erforschung von humanen neuronalen Strukturen aus ethischen Gründen Grenzen gesetzt sind, versucht man pathophysiologische Alterationen indirekt über die Analyse von Körperflüssigkeiten aufzuklären. Diese Methode ist im Zusammenhang mit Wirbelsäulenschäden dadurch

kompliziert, daß die zu untersuchende Läsion lokal relativ eng begrenzt sein kann und eine systemische Antwort im Sinne einer erfaßbaren metabolischen Reaktion nicht zu erwarten ist. Nachweisbare periphere Blut- bzw. Serumveränderungen sind deshalb zunächst eher unwahrscheinlich. Der Liquor cerebrospinalis jedoch umspült die interessierenden nervalen Strukturen, zeigt eine vergleichsweise geringe Zirkulation und bietet sich somit als ein potentiell nutzbares Untersuchungsmedium an. Liquorproben werden bei Myelographien und Spinalanästhesien methodisch bedingt entnommen und stehen der Forschung in begrenzten Mengen ohne zusätzliche Belastung des Patienten zur Verfügung.

1.3 Analyse des Liquor cerebrospinalis - Problem-orientierte Erwägungen

Wissenschaftliche Untersuchungen des Liquor cerebrospinalis sind unter den vielfältigsten Fragestellungen vorgenommen worden. Das Bestreben, klinisch nutzbare Tests zur differentialdiagnostischen Abgrenzung von Krankheitsbildern zu erarbeiten, war häufig vordergründiges Ziel. Relativ wenige laboranalytische Parameter erwiesen sich bereits als geeignet, klinisch vermutete Erkrankungen eindeutig bestätigen zu können (z.B. Zellbild und Zellzahl bei bakterieller und viraler Meningitis, spezifische Tumorzellen bei neoplastischer Absiedlung mit Zugang zum Liquorkompartiment, oligoklonale IgG-Banden bei Immun- und Autoimmunreaktionen im ZNS, Makrophagen bei vermuteter Subarachnoidalblutung). Eine Vielzahl weiterer Parameter vergrößert zwar die Untersuchungspalette erheblich, läßt aber häufig keine Aussage über funktions- oder differentialdiagnostische Relevanz zu.

Der Wert liquoranalytischer Studien für die *ätiologisch-pathogenetische Aufklärung von Erkrankungen des Nervensystems* ergibt sich aus der für den Stofftransport *offenen* Verbindung zwischen Extrazellularraum von Gehirn, Rückenmark bzw. Nervenwurzeln und den Liquorräumen [70]. Der Zufluß von aus nervalen und meningealen Strukturen extrazellulär freigesetzten Substanzen läßt den Liquor cerebrospinalis zum Spiegel *sekretorischer Aktivität der Ursprungsgewebe* werden. Die sekretorische Aktivität ist wiederum ein Maß für den *funktionellen Zustand der die Substanzen freisetzenden Gewebe*. Diese Feststellung kann allerdings nur unter der Voraussetzung gelten, daß weitere

Quellen des Einstroms der zu untersuchenden Substanzen (z.B. über die Blut-Liquor-Schranke) keinen entscheidenden Einfluß auf den speziellen Liquorgehalt der Substanz besitzen, oder gänzlich ausgeschlossen werden können.

Andererseits ist der Gehalt an Substanzen, die ausschließlich über die Blut-Liquor-Schranke in den Liquor gelangen, eine wichtige Informationsquelle über den *funktionellen Zustand der Blut-Liquor-Schranke*.

Die Kompartimente des Liquorraumes weisen unterschiedliche Charakteristika auf, welche in der Zusammensetzung des Liquor cerebrospinalis reflektiert werden. Der lumbale Liquor erscheint wegen der im Lumbalraum eingeschränkten Liquorzirkulation [102] für die Untersuchung funktioneller Eigenschaften der umgebenden Gewebe besonders geeignet. Für Untersuchungen zur Pathogenese degenerativer Erkrankungen der lumbalen Wirbelsäule wäre der lumbale Liquor somit ein potentiell zweckdienliches Medium.

Der im ventrikulären Kompartiment über den Plexus chorioideus ultrafiltrierte Liquor liefert Informationen über die primäre Zusammensetzung, welche im gesamten Liquorraum modifiziert und erweitert wird. Der *ventrikuläre Liquor könnte folglich als eine Art Referenzflüssigkeit* für Untersuchungen des lumbalen Liquors dienen und Auskünfte über einen anzunehmenden ventriculo-lumbalen Gradienten von zu untersuchenden Parametern liefern. Humaner ventrikulärer Liquor ist jedoch unter Erhaltung seiner physiologischen Bedingungen nicht verfügbar, so daß seine normale stoffliche Zusammensetzung aus Analysen pathologisch veränderter Proben approximiert werden muß.

1.4 Blut-Hirn/Rückenmark-Liquor-Schrankenfunktionen

Die Blut-Hirn/Rückenmark-Liquor-Schranken stellen einen steady-state Funktionszustand dar, der aus einem Zusammenwirken morphologischer, physikalischer und biochemischer Korrelate resultiert. Die Schranken sind komplexe dynamische Systeme, die einen fehlenden bis mehr oder weniger restriktiven Stofftransfer zwischen Blut, Liquor und Hirn/Rückenmark (und deren kommunizierenden Extrazellularräumen) bedingen. In dieser Arbeit werden vornehmlich die Blut-Liquor- und die Hirn/Rückenmark-Liquor-Schrankenfunktionen für hochmolekulare Solute, speziell für Proteine betrachtet.

Im Detail sind in die *Blut-Liquor-Schrankenfunktion* der Proteine folgende Korrelate einbezogen, die im Schädigungsfalle pathogenetische Kausalfaktoren darstellen können :

- Das regionen-selektive Profil des *vaskulären Endothels* [226] im Plexus chorioideus [224], im nervalen Gewebe von Hirn und Rückenmark [70] und in der Dura mater, betreffend luminale [155] und abluminale anionische Glykokalices [248] in kontinuierlichen [224] und fenestrierten [181] Abschnitten, fenestrable Diaphragmastrukturen [24,212] und transendotheliale Kanäle [5].
- Molekulare Struktur [90,184] und dynamische Regulationsmechanismen [152] der *tight junctions* [244]. Diese sind die entscheidenden interzellulären (parazellulären) Kontakte der endothelialen Zellen [23,187,265], welche das Blutmilieu vom interstitiellen perivaskulären Milieu trennen. In den nachfolgenden epithelialen Schichten stellen die *tight junctions* die Barriere zwischen dem perivaskulären und dem Liquorkompartiment dar [4,148,149]. Zytoskeletale Strukturen sind an der Regulation der *tight junction* Durchlässigkeit beteiligt [32].
- Die *molekularen Eigenschaften der Proteine*, die über ultrafiltrative Mechanismen vom Blut in den Liquor transferiert werden [85,133].
- Die pulsatile Natur [101] der *Liquorzirkulation* und "shuttle"-Bewegung der kolloidalen mobilen Phase im perivaskulären Raum [111,192,205].
- Neue Erkenntnisse über die regionale Resorption des Liquors liegen vor [185,280,281]. Es besteht offensichtlich ein direkter Zusammenhang zwischen Proteingehalt im Liquor und Liquorresorption über lymphatische Abflußwege [35].

Moderne Hypothesen des Blut-Liquor-Schrankentransfers von Proteinen beziehen sich auf die „fiber matrix theory“ [128,160,179] bzw. auf die „junction-pore-matrix“ Theorie [271].

Die *Hirn/Rückenmark-Liquor-Schranke* ist unter physiologisch normalen Bedingungen für nicht-sekretorische intrazelluläre Proteine dicht, da die Zellmembranen einen transzellulären Transport verhindern. Proteine allerdings, die intrazellulär gebildet und an die Membranaußenseite sezerniert werden, sowie

dort funktionell aktiv sind, werden unter physiologisch normalen Bedingungen im Rahmen ihrer biologischen Lebensdauer in entsprechend geringen, unter Schädigungsbedingungen aber in höheren Konzentrationen über den Extrazellularraum in das damit frei kommunizierende Liquorkompartiment abgegeben. Solche Proteine können somit als Markerproteine für die funktionelle Aktivität ihrer zellulären Herkunftsorte dienen. Als Herkunftsorte kommen Zellpopulationen des Hirnparenchyms, des Myelons, der Nervenwurzeln und der Meningen in Frage.

Dementsprechend sollten die zu analysierenden Substanzen (Parameter) eine *charakteristische Beziehung zu den Geweben besitzen, welche sie sezernieren bzw. für ihren Transfer in den Liquor* den Ursprungsort darstellen. Welche Bestandteile des Liquors können diese Kriterien erfüllen?

Der Liquor cerebrospinalis enthält im Vergleich zum Blut einen sehr geringen, aber hinsichtlich seiner Herkunft weitgehend charakteristischen *Proteinanteil*. Es ist daher naheliegend, nach Proteinen zu suchen, welche durch die mit dem Liquorkompartiment in *direkter Beziehung stehenden Gewebe* produziert werden. Andererseits sind Proteine von Bedeutung, die *nur aus dem Blut in den Liquor* gelangen und damit den funktionellen Zustand der Blut-Liquor-Schranke beschreiben. Ihr Liquor/Serum-Quotient gilt als Funktionskriterium der Blut-Liquor-Schranke.

Stellen die Proteine beider Quellen Enzyme dar, kann sich die Messung der Aktivität als sensible Informationsquelle erweisen. Eine wichtige Voraussetzung für die Bewertung von Meßergebnissen ist die Kenntnis über Kontrollwerte und deren inter- und intraindividuelle Variabilität.

1.5 Parameterauswahl zu Untersuchungen der Pathogenese von Krankheitsbildern, assoziiert mit degenerativen Veränderungen der lumbalen Wirbelsäule

1.5.1 Parameter zur Charakterisierung der Blut-Liquor-Schrankenfunktion

Gesamteiweißkonzentration des Liquors

Die Konzentration des Gesamtproteins im Liquor dient der Information über das Gleichgewicht zwischen dem Proteineinstrom aus den Gefäßen des Plexus chorioideus, der Dura mater bzw. nervalen Gewebe und der Resorption über Lymphe und venöses Blut. Da sich die Blut-Liquor-Schranke als generell sehr restriktiv gegenüber Serumeiweißen erwiesen hat [84], ist unter physiologischen Bedingungen eine relativ konstante, niedrige Konzentration des Gesamteiweißes im Liquor zu erwarten. Bei pathologischen Permeabilitätsveränderungen der Blut-Liquor-Schranke und Resorptionsstörungen findet sich jedoch ein veränderter Wert für das Gesamteiweiß im Liquor. Entlang der Achse der Liquorkompartimente erhöht sich die physiologische Proteinkonzentration, was durch den Eiweißzustrom aus angrenzenden nervalen Geweben erklärt werden kann [70]. Die Gesamteiweißkonzentration des Liquors gilt somit als orientierendes Charakteristikum für die Funktion der *Blut-Liquor-Schranke*, die *Proteinsekretion durch nervale Gewebe und die Resorption*.

Untersuchungen zum Proteingehalt des Liquors bei *degenerativen Erkrankungen der lumbalen Wirbelsäule* wurden seit der ersten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts durchgeführt. Mixter und Barr [186] stellten 1934 erstmals fest, daß Bandscheibenvorwölbungen mit einer Erhöhung der Gesamteiweißkonzentration des lumbalen Liquors gekoppelt sind. Über erhöhte Eiweiß-, Albumin- und IgG-Konzentrationen im lumbalen Liquor von Patienten mit lumbalen Rückenschmerzen ist berichtet worden [240]. Bandscheibenvorfälle wurden ebenfalls als Ursache für eine erhöhte Gesamteiweißkonzentration angenommen [140,238,239].

Albuminquotient Liquor/Serum

Der Albuminquotient Liquor/Serum ist ein weitaus selektiverer Parameter als Gesamtprotein, welcher die *Funktion der Blut-Liquor-Schranke* beschreibt [70,109,252]. Da Albumin nur in der Leber und nicht im ZNS synthetisiert wird, gelangt das Protein somit nur über das Blut in den Liquor.

Ahonen et al. [2] und Skouen et al. [238] zeigten, daß der Albuminquotient Liquor/Serum bei Patienten mit akuten Bandscheibenvorfällen erhöht ist, was die Autoren mit einer Permeabilitätsstörung der Blut-Liquor-Schranke begründeten. Es ist vermutet worden, daß eine lokal abgegrenzte Entzündung im Zusammenhang mit der veränderten Blut-Liquor-Schrankenfunktion steht [198,239].

1.5.2 Parameter zur Charakterisierung funktioneller Aktivität nervaler Gewebe

Um Gewebeschädigungen im Nervensystem zu charakterisieren, wurden in den letzten Jahren verschiedene „gewebespezifische“ Proteine im Liquor analysiert. Aurell et al. [19] untersuchten das S-100 Protein und das saure gliale fibrilläre Protein bei Patienten mit Hirninfarkten und fanden, daß die Ausschüttung der untersuchten Substanzen in den Liquor lokale ischämische Schädigungen der astroglialen Zellen reflektiert. Rosengren et al. [210] deuteten Konzentrationserhöhungen der leichten Untereinheit des Neurofilament-Triplet-Proteins bei neurodegenerativen Erkrankungen als ein meßbares Zeichen für Axonschädigungen. Im Ergebnis einer weiteren Studie empfahlen Rosengren et al. [211] die Bestimmung der Liquorkonzentration des sauren glialen fibrillären Proteins als Marker für nervale Gewebedestruktion.

Brisby et al. [39] berichteten über Erhöhung der Konzentrationen des Neurofilamentären Proteins und des S-100 Proteins bei Patienten mit lumbalen Bandscheibenhernien. Diese Alterationen wurden auf die Schädigung von Axonen und Schwannzellen in den betroffenen Nervenwurzeln zurückgeführt. Die Autoren fanden keine Veränderungen der neuronenspezifischen Enolase oder des sauren glialen fibrillären Proteins. Skouen et al. [237] folgerten aus tierexperimentellen Untersuchungen, daß neurofilamentäres Protein und

Gesamteiweiß des Liquors als Marker für durch Kompression von Nervenwurzeln hervorgerufene nervale Schäden betrachtet werden können. Olmarker und Larsson [196] fanden Tumor-Nekrose-Faktor Alpha ($\text{TNF}\alpha$) in degenerativ verändertem Bandscheibengewebe und vermuteten, daß die in tierexperimentellen Studien nachgewiesene Verringerung der Nervenleitgeschwindigkeit unter dem Einfluß von Nucleus pulposus-Gewebe auf die Präsenz dieser Substanz zurückzuführen sei. Untersuchungen von Brisby et al. [38] zufolge ist die $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration im Liquor von Patienten mit Bandscheibenschäden nicht gesteigert. Interleukin-8 schien dagegen im Liquor besonders von Patienten mit kurzer Krankheitsdauer und sequestrierten großen Vorfällen erhöht, während IL-1 β , IL-6, IFN- γ normal waren [38].

Die wohl umfangreichsten Untersuchungen zur Aufklärung neurodegenerativer Erkrankungen des Gehirns und der damit assoziierten biochemischen Veränderungen wurden und werden bei Patienten mit Alzheimerscher Erkrankung durchgeführt. Die feingeweblichen Analysen der Hirnsubstanz bilden eine Grundlage der Liquorforschung, wobei die Untersuchungen in erster Linie an menschlichem Leichengewebe bzw. in tierexperimenteller Arbeit zu weitreichenden Erkenntnissen führten. Es ist heute bekannt, daß Patienten mit Alzheimerscher Erkrankung niedrige Cholinacetyltransferase- und AChE-Aktivitäten in hippokampalen Bereichen des Hirns aufweisen. Diese Verhältnisse konnten in tierexperimentellen Studien durch Deafferentiation des Hippokampus der Ratte nachempfunden werden [150]. Erhöhte Phosphofruktokinase-Aktivitäten wurden in Hirnarealen von Alzheimer-Patienten ermittelt [28]. In den letzten Jahren wurden veränderte Aktivitäten glykolytischer Enzyme in frontalen und temporalen Arealen des Cortex von Patienten mit Alzheimerscher Erkrankung gefunden, wobei vermutet werden konnte, daß diese Veränderungen mit der reaktiven Astrozytose bei Alzheimerscher Erkrankung in Zusammenhang stehen [29]. Phylogenetische Untersuchungen zeigten die Einmaligkeit der Expressionsmuster von Isoformen des mit dem neuronalen Mikrotubulussystem assoziierten tau-Proteins beim Menschen. Dessen besondere Vulnerabilität gegenüber neurodegenerativen Erkrankungen mit "Tauopathie" (Alzheimer, Frontotemporale Demenz und Picksche Erkrankung) könnte mit den isoformspezifischen Fähigkeiten zur Stabilisierung des neuronalen Mikrotubulussystems in Zusammenhang stehen [120].

Die Mehrzahl der hier kurz erwähnten Studien war an der Zielstellung orientiert, eine in der klinischen Diagnostik nutzbare Markersubstanz für nervale Schädigungen zu finden. Dieses Ziel konnte in erster Linie wegen der großen interindividuellen Variabilität und der geringen Spezifität der gemessenen Parameter nur bedingt erreicht werden. Der eigentliche Wert der Studien liegt trotzdem in verwertbaren Erkenntnissen zur *Pathologie* der untersuchten Krankheitsbilder.

1.5.3 Cholinesterasen als Parameter zur Charakterisierung funktioneller Aktivität nervaler Gewebe bzw. der Blut-Liquor-Schrankenfunktion

Die folgende eingehende Betrachtung der Cholinesterasen ist darin begründet, daß ihre Liquor- und Serumaktivitäten einen hauptsächlichen Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit ausmachen sollten.

Acetylcholinesterase (AChE, E.C.3.1.1.7.)

Die AChE-Aktivität im Liquor kann bisherigen Untersuchungen zufolge als *biochemischer Marker sekretorischer Aktivität AChE-exprimierender nervaler Zellen* angesehen werden. Die AChE-Aktivität ist *unabhängig* von der Funktion der Blut-Liquor-Schranke. Die folgende Darstellung der Eigenschaften, des Vorkommens und der Interaktionen des Enzyms AChE begründet dessen vermutete Eignung für Untersuchungen des Funktionszustandes nervaler Zellen im Rahmen der Fragestellungen der vorliegenden Arbeit.

Molekulare Eigenschaften und Organvorkommen der AChE

AChE gehört zu den am schnellsten wirkenden biologischen Katalysatoren. Die Hydrolyserate von Acetylcholin erreicht die durch die molekulare Diffusionsrate des Substrates limitierte theoretische Grenze der Geschwindigkeit einer Substratumsetzung [206]. Das Enzym AChE hat zentrale Bedeutung innerhalb der cholinergen sowie dopaminergen Neurotransmission und besitzt zusätzliche Modulatorfunktionen neuronaler Eigenschaften.

AChE zeigt einen beträchtlichen strukturellen Polymorphismus. Das Enzym existiert in globulären (G1, G2 und G4) und asymmetrischen Formen (A4, A12).

Letztere weisen einen Membrananker in Kollagen-ähnlicher Form auf. Die katalytischen Untereinheiten entstammen einem einzigen Gen (7q22) [77,250]. Translation und Synthese der G1, G2 und G4 erfolgen im rauen endoplasmatischen Retikulum. Die weitere Aufbereitung von G4, sowie die Bildung der asymmetrischen Formen findet im Golgi-System statt [213].

Atack et al. [17] fanden in post mortem Proben von menschlichem Hirngewebe die höchsten AChE-Aktivitäten im Nucleus caudatus und Nucleus Meynert, niedrigste Werte konnten im Hippocampus und temporalen parietalen Cortex nachgewiesen werden. Bezüglich der molekularen Formen der AChE überwog G4 in allen untersuchten Hirnregionen. Hinsichtlich des Vorkommens der Formen im Hirngewebe ließ sich feststellen, daß die G4-Form der AChE überwiegend membrangebunden vorzuliegen scheint. G1 und G2 sind offensichtlich zu gleichen Teilen membrangebunden bzw. frei löslich.

Spezifische subzelluläre Verteilungen des Enzyms sind bekannt. G1 findet sich in der löslichen Fraktion am endoplasmatischen Retikulum und G2 bzw. G4 sind an Plasmamembranen verankert [117]. Plasmalemm-assoziiertes G4 ist offensichtlich in die Inaktivierung der Acetylcholin-Moleküle im synaptischen Spalt und damit in die cholinerge synaptische Transmissionskette einbezogen [86]. Die asymmetrischen Formen liegen meist an der Zelloberfläche in Assoziation mit der extrazellulären Matrix. Im Rahmen der cholinergen Transmission kontrolliert mit der Basallamina assoziiertes A12 an der neuromuskulären Kopplungsstelle die Menge des Acetylcholins, welches den muskulären Acetylcholin-Rezeptor erreicht [171].

Nach klassischen Ansichten ist AChE ein membrangebundenes Protein. Einige Gewebe (Hirn, Muskel) besitzen jedoch wasserlösliche AChE ohne hydrophobe Domäne [171]. Die dominante amphiphile AChE-Form in Hirnpräparationen des Menschen ist G4. Untersuchungen von Li et al. [161] zeigten, daß durch AChE-Genexpression gewonnenes Enzym eher die Eigenschaften eines *sezernierten* als eines transmembranen Proteins besitzt. Zellkulturen, welche AChE exprimieren, sezernieren diese in das externe Medium [131]. Hierzu gehören kultivierte neuronale Zellen, z.B. Zellen des Nebennierenmarks vom Rind [241]. Von Hirnarealen der Säugetiere ist die *in vivo*-Sekretion der löslichen AChE-Formen bekannt (Hippocampus [6], Cerebellum [10], Substantia nigra [100] und Striatum

[57]). *Motoneurone* enthalten AChE nicht nur im endoplasmatischen Retikulum sondern sezernieren das Enzym auch extrazellulär [146,147]. AChE wurde in ventralen und dorsalen Abschnitten der *Nervenwurzeln* durch Zenker et al. [282] beim Menschen nachgewiesen. Die Autoren fanden Aktivitätsanreicherungen der Cholinesterasen besonders in dünnen myelinisierten Fasern, welche dem vegetativen System zugeordnet wurden. Tierexperimentelle und in vitro-Untersuchungen wiesen AChE in *sensiblen* Anteilen der Nervenwurzeln und *Spinalganglien* nach [88,195]. Kulturen aller Entwicklungsstadien von Spinalganglienzellen und sensiblen Neuronen des Huhns exprimieren AChE [249]. Im Spinalganglion der Katze wurde AChE in den sensiblen Neuronen lokalisiert [141]. G1 fand sich im Zytoplasma, G4 an den Plasmamembranen und G12 der AChE an den Synapsen. *Gliale* [277] und *meningeale* Zellen [257] setzen lösliche AChE frei.

Die Sekretion von AChE im Nervensystem scheint ein Ca^{2+} -abhängiger Prozeß zu sein, welcher unter der Kontrolle physiologischer Stimuli abläuft.

Tierexperimentelle Studien mit im Hippokampus platzierten Kanülen haben gezeigt, daß die lokale AChE-Sekretion durch Aktivierung muskarinerg cholinerg Rezeptoren gesteigert und durch GABA-Agonisten unterdrückt werden kann [9]. Von anderen Hirnregionen liegen Untersuchungsergebnisse vor, die den Eindruck vermitteln, daß die Enzymsekretion auch unabhängig von cholinergen Mechanismen stattfindet. In der Substantia nigra beispielsweise erfolgt die AChE-Sekretion durch nicht-cholinerge dopaminerge Zellen [97]. Im cerebellaren Cortex existieren trotz nachgewiesener hoher AChE Spiegel keine überzeugenden elektrophysiologischen oder neuroanatomischen Anzeichen einer cholinergen Transmission [66].

Die Theorie einer zusätzlichen Modulatorfunktion der AChE hinsichtlich neuronaler Eigenschaften - ohne Relation zur Acetylcholin-Hydrolyse - wird auch von Appleyard und Jahnsen vertreten, die intrazelluläre Untersuchungen an Purkinje Zellen durchführten. Die externe Applikation von AChE verursachte eine in ihrer Intensität gesteigerte synaptische Antwort bei Stimulation der Kletterfasern [6]. Das veränderte Aktionspotentialmuster kann nicht auf die Hydrolyse von Acetylcholin zurückgeführt werden, da einerseits keine Hinweise auf eine cholinerge Transmission im cerebellaren Cortex bestehen und andererseits die gemessenen Veränderungen nicht durch den AChE-Inhibitor

Soman blockiert werden konnten. Da die irreversible Hemmung des aktiven Enzymzentrums mit Soman nicht zu einer Einschränkung der modulatorischen Effekte am Neuron führte, ist anzunehmen, daß die Hemmung der peripheren Domänen des Moleküls eine derartige Einschränkung hervorrufen kann. Für diese Hypothese spricht, daß Faszikuline (natürlich vorkommende AChE-Hemmer im Gift der Mamba) an periphere Molekülbereiche, entfernt vom katalytischen Zentrum der AChE ankoppeln [169]. Mikroinfusionen von Faszikulin in die Substantia nigra der Ratte führt zu einer Hemmung der nigralen AChE und Verhaltensauffälligkeiten des Tieres, die durch den muskarinergen cholinergen Antagonisten Atropin nicht vollständig unterdrückt werden konnten [68]. In ähnlicher Weise führten Mikroinfusionen von Faszikulin in den Locus coeruleus, einer anderen Hirnregion, wo AChE in nichtcholinergen Neuronen nachgewiesen wurde, zu einem signifikanten Anstieg des Noradrenalinspiegels, der sich ebenfalls nicht durch Atropin verhindern ließ [1].

Der AChE wird eine regulatorische Aufgabe bei der Entwicklung von sensibler Nerven und bei der sensiblen Reizübermittlung im Erwachsenenalter zugeschrieben [27,142].

AChE im Liquor cerebrospinalis

Sezernierte AChE diffundiert über den Extrazellularraum ohne zelluläre Schranken in die Liquorkompartimente [264]. Ein maßgeblicher Zufluß von AChE aus dem Blut in den Liquor ist hingegen *nicht* anzunehmen. Nach Untersuchungsergebnissen von Mäder et al. [166] liegen die AChE-Aktivitäten des Serums von Kontrollpersonen bei 5 nmol/min x ml. Die Autoren stellten im Liquor von Patienten mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen weitaus höhere AChE-Konzentrationen fest, als man für ein aus dem Serum über eine intakte Blut-Hirn-Schranke eingeschleustes Protein erwarten könnte. Diese Feststellung geht von der plausiblen Annahme aus, daß bei einer intakten Blut-Liquor-Schranke nicht mehr als 0,1% des Serumenzyms das Liquorkompartiment erreichen dürfte. Obwohl viele der Serumaktivitäten unter dem meßbaren Limit lagen, konnten in den entsprechenden Liquorproben alle AChE-Aktivitäten bestimmt werden. Serumaktivitäten des Enzyms (falls nachweisbar) korrelierten mit den Liquoraktivitäten. Die Ergebnisse dieser Studie erscheinen als Grundlage für die Besprechung der möglichen Herkunftsorte der AChE im Liquor sehr

wichtig, da sie offensichtlich eine Freisetzung des Enzyms aus *neuronalen* Quellen in den Liquorraum beweisen und einen sekundären Transfer in das Blut vermuten lassen. Mäder et al. [166] stellten auch fest, daß mit Blut kontaminierte Liquorproben keine erhöhten AChE-Aktivitäten im Vergleich zu blutfreien Proben zeigen. Erythrozyten besitzen zwar membrangebundene AChE, setzen das Enzym jedoch normalerweise nicht in Serum oder Liquor frei.

Das Molekulargewicht der aus humanem Liquor isolierten AChE wurde mit 380000 bestimmt, was der G4-Form entspricht [189]. Fernandez et al. [86] bestätigten, daß das amphiphile globuläre Tetramer die hauptsächliche Isoform der AChE im Liquor ist.

Die AChE-Aktivität im Liquor wird bereits zur Untersuchung der Funktion von Zellen des ZNS, welche das Enzym freisetzen, genutzt. Man nimmt an, daß Aktivitätsveränderungen Fehlfunktionen des zentralen und peripheren Nervensystems widerspiegeln können. Von dem Enzym wird damit vermutet, daß es als biochemische Markersubstanz für diagnostische und prognostische Aussagen Verwendung finden kann.

Veränderungen der Enzymaktivität im Liquor wurden im Zusammenhang mit neurologischen und psychiatrischen Krankheiten, Vergiftungen oder der Schmerzempfindung und Schmerzmodulation beschrieben. Nach übereinstimmender Ansicht handelt es sich bei der nachgewiesenen AChE-Aktivität um Enzym aus dem Nervensystem. Die folgende Aufstellung veranschaulicht allerdings, wie verschieden die Untersuchungsergebnisse bei einigen ausgewählten Studien ausfielen (Tab. 1).

Tab. 1. Unterschiedliche Trends der in ausgewählten Studien beobachteten AChE-Aktivität im lumbalen Liquor von Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsbildern.

Diagnose	AChE-Aktivität im Liquor		Jahr
	im Vergleich zu	Autoren	
	Kontrollpersonen		
Demenz im Alter	abnehmend	Koponen et al. [144]	1994
Demenz bei Amyotropher Lateralsklerose	unverändert	Hartikainen et al. [107]	1992
Demenz bei Mb.Parkinson	erhöht	Ruberg et al. [214]	1986
Demenz bei Mb.Parkinson	unverändert	Sirviö et al. [236]	1987
Demenz bei Mb.Parkinson	erniedrigt	Hartikainen et al. [107]	1992
Demenz bei Mb.Alzheimer	erniedrigt	Hartikainen et al. [107]	1992
Mb.Alzheimer (frühzeitig einsetzend)	erniedrigt	Kumar et al. [151]	1989
Mb.Alzheimer (möglicher)	erhöht	Huff et al. [116]	1989
Mb.Huntington	erniedrigt	Ruberg et al. [215]	1987
Multiple Sklerose	erniedrigt	Ruberg et al. [215]	1987
Progressive Paralysen	erniedrigt	Atack et al. [15]	1991
Hirnfarkt	erhöht	Wester et al. [273].	1987
Ventrikel/Hirn-Volumen	negative Korrelation	Pearlson und Tune [204]	1986
Verlangsamtes EEG im Alter	erniedrigt	Hartikainen et al. [108]	1992

Die von Atack et al. [18] geäußerte Voraussage, daß sich die AChE-Aktivität im Liquor letztendlich als wichtiger Parameter bei der Differentialdiagnostik von neurologisch-psychiatrischen Erkrankungen erweisen wird, konnte bisher zumindest *nicht anhand „diagnostischer“ Einmalpunktionen bestätigt* werden.

Tierversuche haben gezeigt, daß verschiedene, die neuronale Aktivität stimulierende Faktoren die Sekretion der AChE in den Liquor vervielfachen können. Die Herkunft der in diesen Versuchen nachgewiesenen löslichen AChE ist offensichtlich in den neuronalen und glialen Elementen der die Ventrikel umgebenden Gewebe zu suchen [87]. Greenfield und Smith [98,99] fanden, daß

elektrische Stimulation des Nucleus caudatus, des lateralen Hypothalamus oder der Substantia nigra beim Kaninchen eine erhöhte Konzentration der AChE in der Cisterna magna bewirkt. Untersuchungsergebnissen von Chubb et al. [53] und Fuenmayor et al. [87] zufolge wird die lösliche G4-Form der AChE nach elektrischer Stimulation des Nervus ischiadicus vermehrt in den ventrikulären Liquor abgegeben (Kaninchen, Katze, Ratte). Experimentell induziertes Hirnödem hatte in den tierexperimentellen Untersuchungen von Fuenmayor et al. [87] einen aktivitätssteigernden Effekt auf die ventrikuläre AChE-Aktivität.

Inhibitoren der AChE und klinische Zusammenhänge (Schmerz)

Organophosphorverbindungen (Pestizide, chemische Kampfstoffe) blockieren die neuromuskuläre Kopplung durch Hemmung der AChE und Akkumulation von Acetylcholin. Auch die Butyrylcholinesterase (siehe dort) wird irreversibel durch Organophosphate gehemmt. Die expositionsabhängige Vergiftungssymptomatik steht offensichtlich in Zusammenhang mit der im Serum gemessenen Butyrylcholinesteraseaktivität.

Midtling et al. [180] empfahlen hierzu die Messung der AChE-Aktivität der Erythrozyten, da diese analog die Schädigungen von nervalen Geweben anzeigen könnte. DeBleeker et al. [71] fanden eine erhebliche Senkung der AChE-Aktivität der Erythrozyten bei Vergiftungen mit Parathion bzw. Methylparathion. Gupta et al. [103] analysierten die AChE der roten Blutkörperchen bei Personen, die mit Organophosphaten häufigen Kontakt hatten und konstatierten eine erhebliche Aktivitätsminderung. Venkataraman et al. [263] zeigten eine direkte Korrelation zwischen Vergiftungssymptomen nach Applikation von Methylparathion und erniedrigter AChE-Aktivität der Erythrozyten im Tierversuch. In zusammenfassenden Arbeiten stellten Carlock et al. [48] sowie Sramek und Cutler [243] letztthin jedoch fest, daß Effekte auf die an rote Blutkörperchen gebundene AChE *keine* Schlußfolgerungen hinsichtlich der Beeinflussung der Aktivität des neuronalen Enzyms und damit möglicher nervaler Schäden zulasse.

Die AChE-Aktivität des Liquor cerebrospinalis jedoch eignet sich offensichtlich sehr gut zum Monitoring der Wirkung von AChE-Inhibitoren auf die Freisetzung des neuronalen Enzyms. Cutler et al. [67] konnten eindrucksvoll eine Korrelation der Serumspiegel der Substanz SDZ ENA 713 (Exelon[®]) mit der erzielten

dosisabhängigen AChE-Hemmung im Liquor von Alzheimer-Patienten nachweisen.

Cholinesterasehemmer werden therapeutisch (Donezepil-HCl, Tacrin, Rivastigmin) zur Behandlung der leichten bis mittelschweren Alzheimer-Demenz eingesetzt. Neostigminmethylsulfat und Pyridostigminbromid verwendet man zur Therapie bei Myasthenia gravis, bei Atonie des Magen-Darm-Traktes und der Blase sowie zur Antagonisierung peripher wirkender Muskelrelaxanzien des nicht depolarisierenden Typs (Curare).

Hood et al. [113] applizierten den Cholinesteraseinhibitor Neostigmin intrathekal bei gesunden Probanden und fanden eine signifikante Konzentrationserhöhung des Substrates (der AChE) Acetylcholin im Liquor nach 60 min. Da die in diesen Studien eingesetzten Neostigmindosen von 50 - 200 µg im lumbalen Liquorkompartiment Anfangskonzentrationen von etwa 10^{-5} bis $3,5 \times 10^{-5}$ mol/l des Pharmakons bedeuten, sollte die dortige und auch die gewebsnahe AChE während dieses Untersuchungszeitraumes komplett gehemmt sein und damit keinen Einfluß auf die Regulation des steady-state Spiegels des Acetylcholins im Liquor mehr haben. Der Anstieg des Liquor-Acetylcholins wäre also allein über diesen Weg erklärbar. Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, daß *Schmerz* über körpereigene regulatorische Mechanismen ebenfalls eine erhöhte Acetylcholin-Konzentration im Liquor induziert [78]. Diese Erkenntnisse führen zu der Frage, ob die schmerzbedingte Erhöhung der Acetylcholin-Konzentration durch eine erniedrigte Freisetzung von AChE in den Liquor ausgelöst werden könnte. Sollte dies der Fall sein, müßte die im Liquor gemessene *AChE-Aktivität bei Schmerz vermindert* sein.

Ein weiterer möglicher Zusammenhang zwischen Schmerz und veränderter AChE-Aktivität im Liquor ergibt sich durch die Fähigkeit des Enzyms, als Peptidase wirken und Substanz P hydrolysieren zu können [54]. Substanz P ist offensichtlich ein Neurotransmitter bestimmter sensorischer Neurone, welche im Hinterhorn des Rückenmarks enden und läßt sich dort in hohen Konzentrationen nachweisen. Substanz P wird bei Stimulation nozizeptiver Afferenzen freigesetzt [121]. Ein möglicher Mechanismus zur schnellen Inaktivierung der biologischen Aktivität der Substanz P könnte die Freisetzung von AChE (Peptidaseaktivität) sein [55,56]. Es existieren Studien, welche eine Proteaseaktivität der AChE,

ähnlich der des Trypsins und der Arylacylamidase, nahe legen [50,92,178]. Hypothetisch wäre aufgrund dieser Erkenntnisse zu Freisetzungsmechanismen eine *Erhöhung der AChE-Aktivität* des Liquors unter *Schmerz* zu erwarten.

Die bei laboranalytischen Verfahren zur Bestimmung der AChE-Aktivität verwendeten toxischen Cholinesteraseinhibitoren werden im Abschnitt 3.1.1 besprochen.

Butyrylcholinesterase (BChE, E.C.3.1.1.8.)

Die BChE-Aktivität im Liquor entstammt sowohl nervaler Sekretion, als auch dem Blut. Die Liquoraktivität kann in Relation zur Serumaktivität daher als zusätzlicher *biochemischer Marker der Blut-Liquor-Schrankenfunktion* gewertet werden. Allerdings ist der *Anteil nerval sezernierter BChE an der Liquoraktivität* vorliegenden Erkenntnissen zufolge beträchtlich. Die folgende Übersicht begründet die Verwendbarkeit der BChE-Aktivität für Untersuchungen zu Funktionen meningealer und neuronaler Gewebe, welche sich in Assoziation mit dem lumbalen Liquor befinden.

Molekulare Eigenschaften und Aktivitätsmuster im Serum

Die Butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8; Serum-Cholinesterase oder unspezifische Cholinesterase) wird in der Leber synthetisiert und dominiert entscheidend gegenüber der AChE im Serum. Die molekulare und zelluläre Biologie der BChE ist ausführlich in einer Übersichtsarbeit von Massoulié et al. dargestellt worden [171]. Die Hauptkomponente der Serum-BChE ist das wasserlösliche G4-Tetramer (Molekulargewicht 340000). Jede Untereinheit besteht aus 574 Aminosäuren. Die Untereinheiten werden durch feste, nicht-kovalente Bindungen zusammengehalten, die zwischen den Untereinheiten nachweisbaren Disulfidbrücken sind nicht für die tetramere Organisation des Moleküls verantwortlich. Die komplette Aminosäuresequenz wurde von Lockridge et al. [163] beschrieben. Genlocus E1 (Chromosom 3) kontrolliert die genetischen Varianten des Enzyms (U, F, S, J, K, H). Damit werden AChE und BChE an unterschiedlichen Genloci exprimiert. Es ist nicht möglich, die verschiedenen genetischen Formen der BChE allein durch Enzymaktivitätsmessungen unter Antagonistenzusätzen zu differenzieren, da die einzelnen Aktivitäten der verschiedenen Genotypen überlappen. Durch

Differenzhemmung der Enzyme kann man trotzdem 13 Genotypen beim Menschen annähernd identifizieren. Kalow und Genest [125] entwickelten hierzu den allgemein akzeptierten Inhibitionstest mit Dibucain. Weiterhin wurden u.a. Fluorid und Ro 02-0683 als Hemmstoffe genutzt [173].

Die BChE-Aktivität des Serums ist abhängig vom Alter [201], Geschlecht, Körpergewicht, bei Frauen vom Menstruationszyklus und der Einnahme von Kontrazeptiva bzw. Schwangerschaft [81,159]. Den Blaauween et al. [73] und Lepage et al. [159] bestimmten Referenzbereiche für die BChE im humanen Serum von ca. 2 bis 10×10^3 nmol/min x ml. Chu [52] konnte zeigen, daß die normale interindividuelle Variabilität der BChE im Serum bei 20% liegt. In Erythrozyten konnte keine BChE-Aktivität nachgewiesen werden [36].

Veränderungen der BChE-Aktivität im Serum wurden für mehrere physiologische und pathologische Zustände, genetische Varianten des Enzyms oder als Folge der Interaktion mit BChE Cholinesteraseinhibitoren beschrieben [123].

Bestimmungen der Enzymaktivität im Serum sind von klinischem Interesse, da BChE das kurzwirksame Muskelrelaxans Succinylcholin hydrolysiert und somit dessen Wirkung limitiert.

Die Aktivitätsbestimmung der Serum-BChE wird zur Überwachung der Leberfunktion genutzt. Al-Kassab et al. [3] fanden eine direkte Korrelation zwischen erniedrigten BChE-Konzentrationen im Serum und verminderter Überlebenschance von Patienten im septischen Schock assoziiert mit sekundären Leberschäden. Panchenko et al. [203] empfahlen die regelmäßige Testung der Serum-BChE bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt, um rechtzeitig einem sekundären Leberschaden entgegen wirken zu können. Veränderungen der Serum-BChE wurden bei Lebererkrankungen, wie Metastasen, chronischer Hepatitis und Zhirrose beobachtet [225,274].

Erniedrigte BChE-Aktivitäten im Serum wurden bei Colitis ulcerosa [255], nach chirurgischen Eingriffen [201,267] und bei Unterernährung [266] gefunden. Im Falle von Nierenerkrankungen kann die BChE-Aktivität des Serums je nach Art der Pathologie entweder erhöht oder erniedrigt sein [201,274]. Erhöhte Spiegel fanden sich bei Diabetes mellitus und Hyperthyreose [123].

In einer Übersichtsarbeit beschrieben Soreq et al. [242] die von humanen Tumoren ausgehende Expression abnormer BChE-Aktivität.

Die *physiologische Funktion* der BChE ist *nicht* genau bekannt. Die Hypothese, daß BChE die Hydrolyse von Acetylcholin bei massivem Überschuß an Substrat (exzessive muskuläre Aktivität) an Stelle der AChE übernehme [157], hat sich nicht bestätigt. Auch die Hypothese, welche der BChE eine entscheidende Rolle beim Abbau toxischer Cholinester aus dem Lipidmetabolismus zuschrieben [58], erwies sich als nicht haltbar. Ebenso konnte die Hypothese, daß BChE die im System verfügbaren Ressourcen an Cholin für synthetische Zwecke aufrechterhalte [89] nicht bestätigt werden. Eine weitere Hypothese schrieb der BChE eine entscheidende Bedeutung bei der physiologischen Kontrolle der Spiegel der Substanz P zu [165] - auch diese Ansicht fand letztlich keine Bestätigung. Der offensichtlich existierende Zusammenhang zwischen der BChE-Aktivität im Serum und Lipid- bzw. Lipoproteinspiegeln [41,167] erscheint hinsichtlich einer möglichen regulatorischen Funktion der BChE im Fettstoffwechsel interessant. Der BChE wurde im Zusammenhang mit Pestizid- bzw. Kampfstoffvergiftungen eine protektive Funktion für die AChE bescheinigt [40,208]. Das weitverbreitete Vorkommen von BChE-Varianten mit unterschiedlicher Aktivität kompliziert eine Bewertung der Enzymfunktion [229]. Trotz aller Unsicherheiten behauptete sich bisher die allgemeine Ansicht, daß die BChE eine Schutzfunktion für die AChE haben könnte [156].

Es ist bekannt, daß eine nicht unbedeutende Anzahl von Menschen im Serum keine nachweisbare BChE-Aktivität besitzen und trotzdem keine vordergründigen Gesundheitsprobleme aufweisen. Diese Feststellung bedeutet keineswegs, daß der BChE keine biologische Funktion zukäme. Lockridge [164] postulierte sogar ein alternatives System von Esterasen, welches bei Ausfall der BChE deren wichtige Funktionen nahtlos übernehme. Der in vitro nachweisbaren Enzymaktivität der BChE konnte somit bisher nur keine eindeutige biologische Funktion zugeordnet werden. Es ist auch durchaus möglich, daß die Enzymfunktion der BChE in vitro mehr zufällig und die eigentliche biologische Aufgabe davon völlig unabhängig ist [82].

Hemmung der BChE-Aktivität

Der direkte Zusammenhang zwischen Hemmung der BChE-Aktivität im Serum und der Toxizität von Organophosphorverbindungen und Carbamaten ist bekannt. DeBleeker et al. [71] konnten darstellen, daß bei Personen mit

Insektizidvergiftung (Parathion, Methylparathion) eine starke Senkung der Serum-BChE-Aktivität nachweisbar ist. Gupta et al. [103] führten erniedrigte BChE-Aktivität des Serums bei Personen, die mit Organophosphaten häufigen Kontakt hatten, auf eine Leberschädigung zurück. Venkataraman et al. [263] konnten einen direkten Zusammenhang zwischen letalem Ausgang nach oraler Applikation von Methylparathion und erniedrigter BChE-Aktivität des Serums im Tierversuch nachweisen.

Obwohl keine direkten Schlußfolgerungen aus der Serumaktivität auf den Grad der Vergiftung gezogen werden sollten [190], wird die Aktivitätsmessung der BChE im Serum allgemein für Routineuntersuchungen bei chronisch und akut exponierten Personen angewendet. Wegen der großen individuellen Variabilität der BChE-Aktivität im Serum wurde empfohlen, das Patienten-bezogene Serum für Referenzwertbestimmungen zu nutzen, also mehrfache prophylaktische Untersuchungen durchzuführen. Ein plötzlicher Abfall der BChE-Aktivität sollte kritischer bewertet werden, als eine kontinuierliche Aktivitätssenkung [64,256].

Chen et al. [51] veröffentlichten Studienergebnisse zur laboranalytischen Expositionskontrolle für das Organophosphat Chlorpyrifos (O,O-Diethyl-O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl)-phosphorothioat) und empfehlen, auf die bisher übliche Bestimmung der Serum-BChE zugunsten einer Aktivitätsbestimmung der Erythrozyten-AChE zu verzichten. Letztere sei wegen ihrer biochemischen Ähnlichkeit zur neuronalen AChE ein geeigneterer Indikator. Diese Empfehlung wurde jedoch durch die Erkenntnisse von Carlock et al. [48] in Zweifel gezogen.

Carlock et al. [48] ziehen nach eingehenden Literaturrecherchen der letzten Jahre die Schlußfolgerung, daß BChE-Aktivitätsmessungen im Serum nicht allein zur Einschätzung des Gesundheitsrisikos bei Exposition gegenüber Organophosphorverbindungen und Carbamaten herangezogen werden sollten. Die Autoren empfehlen die vorrangige klinische Einschätzung möglicher cholinergischer Effekte und bei Verfügbarkeit die Analyse spezifischer *neuronaler* AChE-Aktivität.

Medikamente können die BChE-Aktivität im Serum reversibel und irreversibel herabsetzen. Geringe reversible (< 15%) Aktivitätsminderungen bestehen für Enfluran, Halothan und Isofluran, nicht depolarisierende Relaxantien wie Pancuronium und Vecuronium, sowie Antibiotika (Penicillin, Streptomycin).

Verstärkte Aktivitätshemmungen (20-100%) sind bekannt für „Anticholinesterasen“ (Edrophonium, Neostigmin, Pyridostigmin, Tetrahydroaminoacridine), kardiovaskulär wirkende Medikamente (Quinidin, Esmolol), zytotoxische Medikamente (Zyclophosphamid), östrogenhaltige Kontrazeptiva und psychotrope Verbindungen (Phenelthin, Lithium), Glaucomtherapeutika (Echothiophate) und Bronchodilatoren (Bambuterol) [201,274]. Holmes et al. [112] berichtete über eine Hemmung der Plasmacholinesteraseaktivität durch Nitrazepam in vitro. Metoclopramid verursachte in vitro 50% Hemmung der BChE-Aktivität [96,127]. Ranitidin hat in therapeutischen Dosierungen in vivo offensichtlich keinen Einfluß auf die BChE-Aktivität des Serums [126,219,275].

BChE im Nervengewebe und im Liquor cerebrospinalis

Brimijoin and Hammond [36] untersuchten mit immunologischen Testverfahren menschliches *Hirngewebe* und fanden das Enzym BChE in nahezu allen Regionen. Das Cerebellum erwies sich mit 540 ng/g Hirngewebe als enzymreich, während sich im cerebralen Cortex weniger BChE nachweisen ließ (240 ng/g). BChE ist offensichtlich die bestimmende Cholinesterase im cerebralen Cortex (AChE: 99 ng/g). Im Putamen herrschen umgekehrte Verhältnisse mit überwiegender AChE- (6100 ng/g) und niedrigerer BChE-Immunoreaktivität (340 ng/g).

Atack et al. [17] fanden in post mortem Proben von menschlichem Hirngewebe, daß BChE im Gegensatz zu AChE relativ gleichmäßig über die Hirnregionen verteilt vorliegt. Ein niedriges G4/G1 Verhältnis der BChE im embryonalen Gehirn findet sich im Cortex von Patienten mit Mb.Alzheimer. Arendt et al. [13] vermuteten deshalb, daß die Degeneration der cholinergen kortikalen Afferenzen bei Mb.Alzheimer von einem reaktiven neuronalen Aussprossen begleitet ist.

Embryonale Kapillarendothelien des Hirns enthalten offensichtlich BChE, welche ab einer bestimmten Entwicklungsphase an der Zelloberfläche exprimiert wird. Risau et al. [209] betrachteten diese Enzymexpression als spezifisch für die sich entwickelnde Blut-Hirn Schrankenfunktion (tierexperimentelle Studien).

BChE wurde im Rückenmark nachgewiesen [17,72,257]. Zenker et al. [282] fanden BChE in ventralen und dorsalen Abschnitten der Nervenwurzeln beim

Menschen. Tierexperimentelle Untersuchungen konnten zeigen, daß BChE in den sensiblen Neuronen innerhalb von Spinalganglien nachweisbar ist [141].

Die BChE-Aktivität ist im humanen *Liquor* um mehr als drei Größenordnungen niedriger als im Serum. BChE tritt damit über die Blut-Liquor-Schranke (*Serumfraktion*) und nach Freisetzung durch gliale [214,277], meningeale [257] oder neuronale [95,175] Zellen (*ZNS-Fraktion*) in den Liquor ein. Die Serumfraktion passiert die Blut-Liquor-Schranke durch Ultrafiltration über die tight junctions. Die von Zellen des Nervensystems sezernierte Fraktion der BChE erreicht das Liquorkompartiment direkt durch Diffusion aus dem Extrazellularraum. Die Aktivität der BChE im Liquor beschreibt somit *sowohl die Blut-Liquor-Schrankenfunktion, als auch die sekretorische Funktion von Zellen des Nervensystems* [136,257].

BChE-Aktivitätsveränderungen im Liquor wurden bei verschiedenen neurologischen Krankheitsbildern nachgewiesen. Eine veränderte Freisetzung der BChE aus neuronalen und/oder glialen Zellen wurde unter den Bedingungen dieser Erkrankungen vermutet. Die differentialdiagnostische Nutzbarkeit der veränderten BChE-Aktivitäten im Liquor von Alzheimer-Patienten zogen Atack et al. [16] wegen der großen auch bei Normalpersonen nachweisbaren interindividuellen Variabilität der Enzymaktivität in Zweifel. Auch McQueen [173] betonte, daß bisher kein stichhaltiger Beweis für die diagnostische oder therapeutische Nutzbarkeit der Cholinesteraseveränderungen bei Alzheimerscher Demenz erbracht werden konnte.

Tab. 2. BChE-Aktivität im lumbalen Liquor bei ausgewählten Krankheitsbildern; ausgewählte Studien.

Diagnose	BChE-Aktivität im Liquor im Vergleich zu Kontrollpersonen	Autoren	Jahr
Demenz bei Mb.Alzheimer	erniedrigt	Huff et al. [115]	1986
Demenz bei Mb.Alzheimer	erniedrigt	Sirviö et al. [235]	1989
Demenz bei Mb.Alzheimer	erniedrigt	Appleyard et al. [8]	1987
Demenz bei Mb.Parkinson	erhöht	Sirviö et al. [236]	1987
Demenz bei Mb.Parkinson	erhöht	Ruberg et al. [214]	1986
Demenz verschiedener Genese	erniedrigt, keine differentialdiagn. Spezifität	Szilagyi et al. [246]	1987
Demenz verschiedener Genese	erniedrigt, keine differentialdiagn. Spezifität	Shen [233]	1996
dystonische Erkrankungen	erhöht	Ruberg et al. [216]	1988
Hirnfarkt	erhöht	Wester et al. [273].	1987
idiopathische Anfallsleiden	erniedrigt	Basu et al. [22]	1995
Mb.Huntington	erniedrigt	Ruberg et al. [215]	1987
Meningitis und Ventrikulitis	erhöht	Tornel et al. [253]	1993
Multiple Sklerose	erniedrigt	Ruberg et al. [215]	1987

Aus der kurzen Übersicht publizierter Studien der letzten beiden Jahrzehnte (Tab. 2) wird deutlich, warum die BChE-Aktivität im Liquor nicht den entscheidenden Durchbruch zum differentialdiagnostisch nutzbaren Marker erzielen konnte:

- Die Ergebnisse der Untersuchungen sind wegen der physiologisch hohen interindividuellen Variabilität der Enzymaktivität uneinheitlich.
- Regelrechte *Referenzwertbestimmungen* für die BChE im *lumbalen Liquor* wurden bisher nicht vorgenommen.
- Bestimmungs- und Differenzierungsmethoden für Cholinesterasen bei simultanem Vorkommen beider Enzyme sind different und anfechtbar. Auf diese Problematik wird detailliert im Kapitel 3.1.1 eingegangen.

Bei der Interpretation von BChE-Aktivitätsbestimmungen sollte grundsätzlich beachtet werden, daß isolierte Meßergebnisse vielfältig gedeutet werden können [274].

Schlußfolgerungen aus bisherigen Untersuchungsergebnissen im Hinblick auf arbeitshypothetische Ansätze

- Die Cholinesterasen AChE und BChE bieten sich als funktionsbezogene Parameter für die Untersuchung der Hirn/Rückenmark-Liquor-Sekretion an. Der Albuminquotient Liquor/Serum erlaubt die Funktionsanalyse der Blut-Liquor-Schranke.
- Es ist anzunehmen, daß durch Schädigung nervaler und meningealer Strukturen Aktivitätsänderungen der AChE und der BChE auftreten und nachweisbar werden. Dies ist auch für lokale degenerative Veränderungen der lumbalen Wirbelsäule und begleitende schmerzhaft funktionseinschränkungen zu vermuten. Untersuchungen von innerhalb der klinischen Diagnostik und Therapie gewonnenen Liquorproben können bei Kenntnis der assoziierten klinischen und bildgebenden Befunde mögliche pathogenetische Zusammenhänge aufklären.
- Ein hypothetischer Ansatz wäre die Vermutung, daß Rückenschmerzen regulatorische Mechanismen auslösen, die zu einer *Erniedrigung* der AChE-Aktivität im Liquor mit nachweisbarer konsekutiver Erhöhung der AcetylcholinKonzentration führen (siehe Abschnitt: Inhibitoren der AChE und klinische Zusammenhänge). Andererseits könnte sich eine nachweisbare *Aktivitätserhöhung* beider Cholinesterasen im Liquor durch gesteigerte funktionelle Aktivität der Zellen des Nervengewebes ergeben (hypothetisch bedingt durch lokale Stimulation der Enzymsekretion unter Schädigungsbedingungen). Auch die erwähnte Hypothese der vermehrten Sekretion von AChE mit dem Ziel der Hydrolyse von unter Schmerzbedingungen freigesetzter Substanz P wäre bei nachgewiesener Aktivitätserhöhung der AChE im Liquor zu diskutieren.
- Parallele Untersuchungen des Albuminquotienten Liquor/Serum bzw. der AChE-Aktivität im Liquor könnten Zusammenhänge zwischen alterierter

Funktion der *Blut-Liquor-Schranke* und der *Hirn/Rückenmark-Liquor-Sekretion* aufzeigen.

- Verlaufsuntersuchungen basierend auf ethisch vertretbaren Mehrfachpunktionen könnten Fehler reduzieren, die aus der relativ großen interindividuellen Variationsbreite der gemessenen Parameter resultieren.
- Für die Interpretation von Veränderungen der Cholinesteraseaktivitäten im Liquor sollten begleitende Alterationen bekannter funktionsbeschreibender Parameter (Gesamteiweiß, Zellzahl, Differentialzellbild, Immunglobuline) herangezogen werden. Dies ist zudem für die Untersuchung der Gleichgewichtseinstellung des Blut-Liquor-Transfers von Proteinen mit differenten Molekülparametern bedeutsam.

2. Ziel und Konzept

Aus ätiologischer Sicht sind Krankheitsbilder, welche mit degenerativen Veränderungen der lumbalen Wirbelsäule einhergehen, durch mechanische knöcherne bzw. bindegewebige Alteration der nervalen und meningealen Strukturen begründet. Eine kausale Therapie wird auf operativem Wege angestrebt, ist jedoch in der Mehrzahl der zu behandelnden Fälle nicht indiziert. Basierend auf klinischen Erfahrungen stellt sich die Frage nach therapeutischer Einflußnahme auf Schmerz und Funktionseinschränkung. Die Pathogenese dieser klinischen Erscheinungsbilder ist nicht umfassend untersucht worden. Bildgebende und elektrophysiologische Untersuchungsverfahren gestatten zwar Rückschlüsse auf das pathologische Geschehen, erlauben jedoch keine gezielte Untersuchung der Funktion lokal betroffener Gewebe. Die referierten Erkenntnisse aktueller neurochemischer und neuromorphologischer Studien eröffnen die Möglichkeit eines analytischen Untersuchungsansatzes über den *Liquor cerebrospinalis*.

Arbeitshypothese

Als *Arbeitshypothese* wird formuliert, daß aus Aktivitäts- bzw. Konzentrationsänderungen der AChE, BChE, des Albumins und Gesamteiweißes in Liquor und Serum zusätzliche Informationen zur Pathogenese von Schmerz und Funktionsminderung bei degenerativen lumbalen Wirbelsäulenerkrankungen gewonnen werden können. Verlaufsuntersuchungen dieser Parameter unter therapeutischen Bedingungen (operative Eingriffe, Spinalanästhesie, rückenmarksnahe Infiltrationen) sollten weitere Einsichten vermitteln.

Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Studien ist es, zu analysieren, ob eine durch degenerative Veränderungen der Lendenwirbelsäule verursachte Alteration neuraler Strukturen und/oder der Meningen signifikante Veränderungen der arbeitshypothetisch als funktionsrelevant prognostizierten Liquorparameter induziert.

Konzeptionell integrierte Teilzielstellungen

- Entwicklung methodisch zuverlässiger *Bestimmungsverfahren* der im Liquor simultan vorkommenden AChE- und BChE-Aktivitäten und Feststellung entsprechender *Referenzwerte* im lumbalen Liquor.
- Untersuchung des Einflusses häufig in Orthopädie und Neurologie verwendeter Medikamente auf das Analyseverfahren der Cholinesteraseaktivitäten (*methodische Störeffekte*).
- Vergleichende Untersuchungen *ventrikulärer Liquores* von neurochirurgischen Patienten zur Beurteilung ventriculo-lumbaler Aktivitätsgradienten der Cholinesterasen.
- Untersuchung des Einflusses *operativer Eingriffe* und der Applikation des *Lokalanästhetikums Bupivacain* auf die analysierten Liquorparameter.

3. Methoden

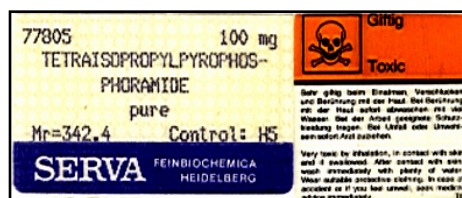
3.1 Parameter, Analyseverfahren

3.1.1 AChE und BChE

Zunächst ergaben sich aus Literaturstudien und praktischen Erwägungen einige Fragen hinsichtlich der *Methodik zur Aktivitätsbestimmung der Cholinesterasen in Liquor und Serum*. Die mit verschiedenen Techniken zur Bestimmung der Cholinesteraseaktivitäten im Liquor erzielten Ergebnisse zeigen untereinander deutliche Abweichungen.

In bisherigen laboranalytischen Differenzierungsverfahren der Cholinesterasen werden (weitgehend) selektive Inhibitoren für AChE bzw. BChE genutzt. Diese Verbindungen (*BW284c51* als Inhibitor für AChE und *isoOMPA* als Inhibitor für BChE; Abb. 5) sind wegen ihrer hohen Toxizität bereits bei direktem Körperkontakt eine potentielle Gefahr für den Anwender. *BW284c51* blockiert kompetitiv anionische periphere Domänen des AChE-Moleküls, das Alkylphosphat *isoOMPA* blockiert ebenfalls kompetitiv analoge Molekülstrukturen der BChE.

Abb. 5. Für Differenzierungsmethoden zur Bestimmung von Cholinesteraseaktivitäten in Körperflüssigkeiten, die sowohl AChE, als auch BChE enthalten (Liquor cerebrospinalis) werden in vielen Laboratorien die hochtoxischen Hemmstoffe *BW284c51* (1,5-bis(4-Allyldimethylammoniumphenyl)pentan-3-eins Dibromid) bzw. *isoOMPA* (Tetraisopropylpyrophosphoramid) eingesetzt.



Inhibitor-freier Test [134]

Zur Verbesserung der Methodik wurden der kolorimetrischen Test nach Ellman et al. [80] modifiziert und im eigenen Labor ein *Inhibitor-freie Test* [134] zur parallelen Bestimmung von AChE- und BChE-Aktivität im Liquor entwickelt.

Das kolorimetrische Testprinzip nach Ellman [80] besteht in der Reaktion des aus der enzymatischen Spaltung (AChE, BChE) der Substrate Acetylthiocholin (ACh) bzw. Butyrylthiocholin (BCh) entstehenden Thiocholins mit 5-5'Dithio bis-(2-nitrobenzoesäure) (3,3'-6) (DTNB), die dabei in 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure mit einem Absorptionsmaximum zwischen 400 und 440 nm gespalten wird.

Das Konzept des Inhibitor-freien Tests basiert auf folgenden Erkenntnissen und Schlußfolgerungen:

- Die kolorimetrische Meßmethode der BChE im Serum erfordert dessen Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1/100 bzw. 1/200. Die AChE-Aktivität liegt jedoch in derart verdünntem Serum unterhalb der Erfassungsgrenze des analogen kolorimetrischen Tests und konkurriert damit nicht mit der BChE-Aktivität bei Verwendung des Substrats ACh.
- Im *Liquor* sind BChE und AChE in vergleichbaren Aktivitäten vorhanden, die unverdünnt meßbar sind.
- Die BChE des Serums und des Liquors reagiert mit den beiden Substraten ACh und BCh in einem *für das Individuum definierten Aktivitätsverhältnis* ($QBChE_{SE}$ bzw. $QBChE_{CSF}$).
- Unter der Bedingung einer maximalen Substratkonzentration von 5 mmol/l gilt: $QBChE_{SE} = QBChE_{CSF}$.
- AChE reagiert nur mit dem Substrat ACh.
- Wenn die BChE des Liquors mit beiden Substraten im gleichen Aktivitätsverhältnis wie die BChE des Serums reagiert, muß die nicht mit dem Substrat BCh reagierende *AChE* des Liquors mittels des im parallelen Serum bestimmten $QBChE_{SE}$ und der gesamten Liquorenzymaktivitäten gegen ACh und BCh bestimmbar sein. Die Anwendung von Inhibitoren erübrigt sich.

Die zur Berechnung der Aktivität der AChE im Liquor erforderlichen Meßgrößen sind:

- individuelles Aktivitätsverhältnis der BChE im Serum gegenüber den Substraten ACh und BCh ($QBChE_{SE}$),
- kolorimetrisch als Extinktionsdifferenzen (ΔE) gemessene totale Hydrolyseraten von ACh ($\Delta E_{ACh_{CSF}}$) und BCh ($\Delta E_{BCh_{CSF}}$) im Liquor.

Berechnungsformel:

$$AChE_{CSF} = [\Delta E_{ACh_{CSF}} - QBChE_{SE} \times \Delta E_{BCh_{CSF}}] \times F$$

Anmerkung: Die vollständige Ableitung der Berechnungsformel und detaillierte Angaben zu Untersuchungen hinsichtlich der methodischen Zuverlässigkeit des Verfahrens finden sich im Anhang 1. Der Inhibitor-freie Test wurde mit Methoden verglichen, welche die genannten Cholinesterase-Inhibitoren zu Differenztesten verwenden. Die Methode unter Verwendung von BChE-Inhibitor ist wegen des inkompletten Hemmeffektes als unpräzise anzusehen. Während sich keine signifikanten Unterschiede der bestimmten Enzymaktivitäten im Vergleich zwischen der Methode unter Verwendung von AChE-Inhibitor und dem Inhibitor-freien Test ergaben, besitzt letztere entscheidende Vorteile: (1) die Methode benötigt *keine* toxischen Hemmstoffe, (2) *minimiert* das Liquortestvolumen und (3) erlaubt eine parallele Bestimmung *beider* Cholinesteraseaktivitäten im Liquor.

Der Inhibitor-freie Test wurde für alle vorliegenden Studien zur Bestimmung der AChE- und BChE-Aktivitäten im Liquor eingesetzt.

Beschreibung der Testmethode

- Lineare Reaktionszeit bei 37°C: 20 min
- Testendkonzentrationen für Substrate ACh und BCh: je 5 mmol/l
- Testendkonzentration für Stopp-Reagenz Eserinsalizylsäure: 0,2 mmol/l
- Testendkonzentration DTNB: 1 mmol/l
- Prüflösungen Liquor (unverdünnt) und Serum (verdünnt 1/100 bis 1/200 mit physiologischer Kochsalzlösung)
- 1,3 ml Reaktionsvolumen und 1,8 ml Endvolumen nach Zusatz des Stopp-Reagenz

Die Testansätze zur Bestimmung der für die Berechnungen erforderlichen Meßgrößen wurden in Tab. 3 zusammengestellt.

Tab. 3. Testansätze zur Bestimmung von AChE_{CSF}, BChE_{CSF}, BChE_{SE} und QBChE_{SE}

Ansatz zur Bestimmung im Liquor (Summe AChE_{CSF} + BChE_{CSF} bzw. BChE_{CSF})				
Lösungen	Summe AChE_{CSF} + BChE_{CSF}		BChE_{CSF}	
	Liquor gegenüber Substrat ACh		Liquor gegenüber Substrat BCh	
	Leerwert	Hauptwert	Leerwert	Hauptwert
<i>Substrat ACh</i>	200 µl	200 µl	-	-
<i>Substrat BCh</i>	-	-	200 µl	200 µl
<i>DTNB</i>	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl
<i>Prüflösung</i>	-	100 µl	-	100 µl
<i>Liquor</i>				
	Inkubation 20 min bei 37°C im Wasserbad			
<i>Eserinsalizylsäure</i>	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
<i>Prüflösung</i>	100 µl	-	100 µl	-
<i>Liquor</i>				
Ansatz zur Bestimmung im Serum (QBChE_{SE} bzw. BChE_{SE})				
Lösungen	Serum gegenüber Substrat ACh		Serum gegenüber Substrat BCh	
	Leerwert	Hauptwert	Leerwert	Hauptwert
<i>Substrat ACh</i>	200 µl	200 µl	-	-
<i>Substrat BCh</i>	-	-	200 µl	200 µl
<i>DTNB</i>	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl
<i>Prüflösung Serum</i>	-	100 µl	-	100 µl
<i>1/100</i>				
	Inkubation 20 min bei 37°C im Wasserbad			
<i>Eserinsalizylsäure</i>	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
<i>Prüflösung Serum</i>	100 µl	-	100 µl	-
<i>1/100</i>				

Die enzymatisch abgespaltene 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure wurde bei 412 nm gemessen. Die Enzymaktivitäten (nmol/min x ml) wurden durch Multiplikation der Extinktionsdifferenz (ΔE) während 20 minütiger linearer Hydrolyse mit den Faktoren $F = 65$ für den unverdünnten Liquor und, $F = 6500$ und $F = 13000$ für

1:100 bzw. 1:200 verdünnte Sera errechnet. Diese Faktoren resultieren aus den Volumina der reagierenden Substanzen, dem Endvolumen von 1,8 ml nach Eserinsalizylsäure-Stopp, dem Verdünnungsfaktor der Sera, der Reaktionszeit von 20 min und dem millimolaren Extinktionskoeffizienten von 13,88.

Die folgenden Formeln wurden zur Berechnung der Enzymaktivitäten verwendet.

Die totale *BChE-Aktivität des Serums* entspricht der Enzymaktivität des Serums gegenüber dem Substrat BCh:

$$\text{BChE}_{\text{SE}} = \Delta \text{EBCh}_{\text{SE}} \times F \quad (F = 6500 \text{ bis } 13000).$$

Durch zusätzliche Messung der BChE-Aktivität des Serums gegenüber dem Substrat ACh:

$$\text{BChE}^{\text{ACh}}_{\text{SE}} = \Delta \text{EACH}_{\text{SE}} \times F \quad (F = 6500 \text{ bis } 13000)$$

kann das *individuelle Verhältnis der BChE-Aktivität des Serums* gegenüber den Substraten ACh und BCh berechnet werden:

$$\text{QBChE}_{\text{SE}} = \Delta \text{EACH}_{\text{SE}} / \Delta \text{EBCh}_{\text{SE}}.$$

Die totale *BChE-Aktivität des Liquors* entspricht der BChE-Aktivität des Liquors gegenüber dem Substrat BCh:

$$\text{BChE}_{\text{CSF}} = \Delta \text{EBCh}_{\text{CSF}} \times F \quad (F = 65).$$

Die *AChE-Aktivität des Liquors* errechnet sich aus der Formel:

$$\text{AChE}_{\text{CSF}} = [\Delta \text{EACH}_{\text{CSF}} - \text{QBChE}_{\text{SE}} \times \Delta \text{EBCh}_{\text{CSF}}] \times F \quad (F = 65).$$

Anmerkung: Im Ergebnis der Untersuchungen zur in vitro-Hemmung der AChE-Aktivität durch ausgewählte Medikamente (Abschnitt 4.4 und 4.5) wurde ein weiteres Testverfahren (Bupivacain-Hemmtest; Anhang 2) entwickelt und publiziert [135]. Der Bupivacain-Hemmtest wurde jedoch *nicht* für die in dieser Arbeit erläuterten Studien eingesetzt.

3.1.2 Gesamteiweißkonzentration im Liquor, Albuminquotient Liquor/Serum

Die Gesamteiweißkonzentration des lumbalen (GEW_{LU}) bzw. des ventrikulären Liquors (GEW_{VE}) wurde mit herkömmlicher nephelometrischer Methode bestimmt: Trichloressigsäurefällung; Messung im Reaktionsmaximum.

Der Albuminquotient Liquor/Serum für lumbalen Liquor (QALB_{LU}) und ventrikulären Liquor (QALB_{VE}) wurde aus den entsprechenden Konzentrationen des Albumins im lumbalen Liquor (ALB_{LU}) und ventrikulären Liquor (ALB_{VE})

bzw. im Serum (ALB_{SE}) errechnet. Der Albuminquotient wurde in den folgenden Analysen ohne die Zehnerpotenz (10^{-3}) angegeben. Diese Vereinfachung erfolgte aus praktischen Erwägungen, jedoch unter dem Verständnis, daß sich die Dimensionen der Liquor- und Serumkonzentrationen des Albumins um drei Größenordnungen unterscheiden. Die Bestimmung der Albuminkonzentration erfolgte nach Bindung an Antikörper ebenfalls nephelometrisch (Standardmethode).

3.1.3 Weitere Parameter

Alle weiteren Parameter wurden nach klinisch-chemischen Standardmethoden bestimmt.

Blutanalyse: Hämoglobingehalt, Hämatokrit, Leukozytenzahl, C-reaktives Protein, Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, ALAT, γ -GT, Gerinnungsparameter.

Liquor: Leukozytenzahl (LZ) in Zellen/ μ l, Differentialzellbild, Liquor/Serum-Quotienten von IgG, IgA und IgM.

3.1.4 Testsubstanzen

Acetylthiocholinjodid ($\geq 99\%$), Butyrylthiocholinjodid ($\sim 99\%$), 5-5'Dithio bis-(2-nitrobenzoesäure) (3,3'-6) ($\sim 99\%$) und Eserinsalizylsäure der Firma Fluka BioChemika wurden verwendet.

Bupivacainhydrochlorid (Bupivacain) 2,5 mg in 1 ml isobarischer Lösung (Carbostesin 0,25% von Astra GmbH, Wedel, Deutschland) wurde für alle experimentellen und klinischen Anwendungen genutzt.

Für die Entwicklung der Analyseverfahren: Gereinigte AChE (Cholinesterase, Acetyl C 2888 Typ V-S von Electrophorus electricus; 1000–2000 U/mg) und gereinigte BChE (Cholinesterase, Butyryl C 4290 aus Pferdeserum, hoch gereinigt mindestens 500 U/mg) wurden von Sigma-Aldrich Company bezogen.

3.1.5 Entnahmebedingungen der Liquor- und Serumproben

Lumbalpunktionen wurden in den Zwischenwirbelräumen L3 bis S1 mit einer 22 Gauge Spinalnadel unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die ventrikulären Proben wurden einem lateralen Ventrikel entweder über ein liegendes

Drainagesystem oder direkt während eines neurochirurgischen Eingriffes entnommen. Serumproben entstammen venösem Blut, welches zeitgleich mit der Liquorpunktion entnommen wurde. Liquor und Serum wurden innerhalb von 4 Stunden nach der Entnahme untersucht. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4 °C.

3.2 Untersuchte Personen

3.2.1 Kontrollgruppen

Den im Zentrum für Liquordiagnostik (Funktionsbereich Neurobiochemie der Neurologischen Klinik) der Friedrich-Schiller Universität Jena ab 1995 untersuchten lumbalen Liquores konnte nach abgeschlossener klinischer Untersuchung zu einem großen Teil eine umfassende Krankengeschichte mit gesicherter Diagnose zugeordnet werden. Liquorproben von neurologischen und orthopädischen Patienten, welche nach Kontrolluntersuchungen zum Zeitpunkt der Lumbalpunktion als gesund eingestuft werden konnten, wurden in die Auswahl für Kontrollwerte einbezogen. Die orthopädischen Patienten waren im Rahmen einer Spinalanästhesie zur Extremitätenchirurgie punktiert worden. Keine der Personen litt zum Zeitpunkt der Punktion unter einer neurologisch-psychiatrischen Erkrankung oder unter einer manifesten Dysfunktion innerer Organe. Es wurden nur Liquorproben von Patienten mit nicht maßgeblich von Referenzwerten abweichenden Blutanalysen genutzt. 24 Stunden vor der Liquorpunktion waren keine Medikamente eingenommen worden. Die Ausnahme bildeten orthopädische Patienten, welche 1 Stunde vor dem geplanten operativen Eingriff eine Prämedikation (5 mg Midazolam intramuskulär) erhielten. Folgende Liquorparameter mußten dem Normalbereich entsprechen: Gesamteiweiß (GEW_{LU}): 150 - 350 mg/l; Albuminquotient Liquor/Serum ($QALB_{LU}$): < 8 ; Leukozytenzahl (LZ): $\leq 5/\mu l$; Differentialzellbild; Liquor/Serum-Quotienten von IgG, IgA und IgM in Relation zum Albuminquotienten im Rahmen des Normalbereiches nach dem standardisierten Reiber-Schema, also auf keine intrathekalen Immunglobulinsynthesen hinweisend.

Kontrollgruppe für Untersuchungen zu Cholinesteraseaktivitäten und Blut-Liquor-Schrankenfunktion im lumbalen Liquor bei degenerativen Veränderungen der Lendewirbelsäule (Kapitel 6)

47 lumbale Liquorproben von 15 Männern (mittleres Alter \pm SEM = $39,9 \pm 3,1$ Jahre; 27 - 68 Jahre) und 32 Frauen (mittleres Alter \pm SEM = $45,6 \pm 2,4$ Jahre; 27 - 79 Jahre) erfüllten die genannten Auswahlkriterien für die Kontrollgruppe. Für die gesamte Kontrollgruppe betrug das mittlere Alter (\pm SEM) 44 ± 2 Jahre (27 – 79 Jahre).

Kontrollgruppe für Untersuchungen zur Normalwertbestimmung der Cholinesteraseaktivitäten im lumbalen Liquor (Kapitel 4 und 5)

Bei Abschluß der Untersuchungen zu Normalwertbestimmungen (Kapitel 4 und 5) konnte die Kontrollgruppe um 17 Proben erweitert werden, so daß insgesamt 64 lumbale Liquorproben (entnommen von 19 Männern: mittleres Alter \pm SD = $36,6 \pm 12,9$ Jahre; SEM: $\pm 2,9$ Jahre; 16 - 68 Jahre und 45 Frauen: mittleres Alter \pm SD = $39,2 \pm 16,0$ Jahre; SEM: $\pm 2,4$ Jahre; 16 - 79 Jahre) als Kontrollgruppe in die Analysen eingingen. Für die gesamte Kontrollgruppe betrug das mittlere Alter (\pm SEM) $38,4 \pm 1,9$ Jahre (16 - 79 Jahre).

Anmerkung:

Alter, Liquor- und Serumparameter der beiden Kontrollgruppen unterschieden sich nicht signifikant ($p > 0,05$) hinsichtlich der Mittelwerte, der Varianzen sowie des Verteilungsmusters. Die unterschiedliche Probenanzahl ergab sich aus dem zum Zeitpunkt der Untersuchungen verfügbaren Untersuchungsgut.

In beiden Kontrollgruppe ließen sich keine signifikanten ($p > 0,05$) geschlechtsspezifischen Unterschiede bezüglich der untersuchten Parameter bzw. des Alters nachweisen. In den Angaben zu Patientengruppen und den Analysen der Untersuchungsergebnisse wurde deshalb *keine* geschlechtsspezifische Trennung der untersuchten Meßgrößen bzw. des Alters vorgenommen.

3.2.2 Patientengruppen

Patienten für Untersuchungen ventrikulärer Liquorproben (Kapitel 4 und 5)

169 ventrikuläre Liquorproben, entnommen von 90 neurochirurgischen Patienten (50 Männer: mittleres Alter \pm SEM = $46,9 \pm 2,5$ Jahre, 2/12 - 77 Jahre und 40 Frauen: mittleres Alter \pm SEM = $52,9 \pm 2,9$ Jahre, 12 - 86 Jahre) wurden untersucht. Folgende Diagnosegruppen fanden sich bei diesen Patienten: Hirntumor, Hirnblutung, bakterielle Meningitis/Enzephalitis, Hydrozephalus, Meningitis ungeklärter Ursache, Subarachnoidalblutung, Schädel-Hirn Trauma, Hirnabszeß, Rückenmarkstumor.

Patienten für Untersuchungen zu Cholinesteraseaktivitäten und Blut-Liquor-Schrankenfunktion im lumbalen Liquor bei degenerativen Veränderungen der Lendenwirbelsäule (Kapitel 6)

62 Liquor- und Serumproben von Patienten (33 Männer, 29 Frauen) mit lumbalen Rückenschmerzen, radikulär bzw. pseudoradikulär ausstrahlender Schmerzsymptomatik oder Claudicatio spinalis wurden ausgewählt. Das mittlere Alter (\pm SEM) der Patienten betrug 45 ± 2 Jahre (27 - 77 Jahre). Die Patientenauswahl erfolgte konsekutiv, d.h. die Verteilung der verschiedenen Diagnosen war zufällig. Die MRT-Diagnostik zeigte in allen Fällen einen direkten Kontakt von Bandscheibenvorfällen oder Spondylophyten zur Dura bzw. zu Nervenwurzeln. Patienten mit einer Erkrankungsdauer (Zeitintervall vom Einsetzen der Symptomatik bis zur Lumbalpunktion) von weniger als 4 Wochen wurden als akute Fälle definiert, alle anderen als chronisch. Neurologische Defizite wurden durch elektrophysiologische Untersuchungen bestätigt. Patienten mit zusätzlichen neurologischen, psychiatrischen oder manifesten klinisch relevanten internistischen Erkrankungen wurden aus der Studie ausgeschlossen. Personen mit kontrollierter milder arterieller Hypertonie (niedrig dosierte Antihypertensiva) wurden im Untersuchungsgut belassen. Alle Patienten hatten vor der Lumbalpunktion Analgetika oder nicht steroidale Antirheumatika eingenommen.

Patienten für Untersuchungen zum Einfluß von Bupivacain auf Cholinesteraseaktivitäten, Gesamtprotein und Albuminkonzentration in Serum und Liquor (Kapitel 7)

An der Studie nahmen nur Personen mit primär normalen Laborparametern (Ausgangswerte der Blut- und Liquoranalyse) teil. Die gruppenspezifischen Personenzahlen und Altersverteilungen sind dem Abschnitt 7.1 zu entnehmen.

3.3 In vitro-Testung zum Einfluß von Medikamenten auf die Testsysteme zur Bestimmung der Cholinesteraseaktivitäten

In vitro-Tests hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung des AChE- und BChE-Testsystems durch Medikamente wurden durch deren Zusatz zu Gemischen von normalen lumbalen Liquores und normalen Serumproben durchgeführt, wobei die Endkonzentrationen der getesteten Medikamente im Bereich zwischen 10^{-7} mol/l und 10^{-4} mol/l lagen. Die Enzymaktivitäten wurden mit dem Inhibitor-freien Testverfahren [134] gemessen. Die Endkonzentrationen der Substrate Acetylthiocholinjodid und Butyrylthiocholinjodid betrugen 5 mmol/l. Die in vitro-Wirkung folgender Medikamente auf die AChE- bzw. BChE-Aktivität wurde analysiert: *Atropin*, Cefotaxim, Ceftriaxon, Ciprofloxacin, Dexamethason, *Digitoxin*, *Dimetinden*, *Droperidol*, *Furosemid*, Haloperidol, *Heparin*, Ketamin, Lidocain, *Metoclopramid*, Metoprolol, Metronidazol, *Midazolam*, *Morphin*, *Neostigmin*, Omeprazol, Pancuronium, Phenytoin, Piperacillin, *Prednisolon*, *Prilocain*, *Ranitidin*, *Suxamethonium*, *Theophyllin*, Thiopental, *Verapamil*. Medikamente, welche einzelne Patienten aller hier vorliegenden Studien innerhalb von 48 Stunden vor der Entnahme von Liquor- bzw. Serumproben erhalten hatten, wurden kursiv dargestellt. Die Ergebnisse der in vitro-Tests wurden hinsichtlich einer Medikament-bedingten Beeinflussung der AChE-Aktivität lumbaler Liquorproben im Abschnitt 4.4 und hinsichtlich der Beeinflussung der BChE-Aktivität im Abschnitt 5.4 dargestellt. Effekte des Lokalanästhetikums Bupivacain auf Cholinesteraseaktivitäten und weitere Liquor- bzw. Serumparameter fanden im Abschnitt 4.4 und 4.5 Erwähnung und wurden ausführlich im Kapitel 7 sowie Anhang 2 erläutert.

3.4 Statistische Analyse

Daten wurden entsprechend ihrem Verteilungsmuster entweder als Mittelwert \pm SD (Standardabweichung) oder als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler) angegeben. Bei einigen Analysen wurden die Grenzen des 95% Konfidenzintervalls berechnet. Die Datenverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov Test (korrigiert nach Lilliefors) bzw. dem Shapiro-Wilk-Test geprüft. Die Signifikanz von Differenzen der Mittelwerte zwischen Gruppen erfolgte entsprechend der Datenverteilung und der Abhängigkeit der Daten voneinander entweder mit dem T-Test oder mit nicht parametrischen Tests (Mann-Whitney-Test bei zwei unabhängigen Stichproben; Kruskal-Wallis-Test bei mehreren unabhängigen Stichproben; Wilcoxon-Test bei zwei verbundenen Stichproben; Friedman-Test bei mehreren verbundenen Stichproben). Varianz-Komponenten wurden im allgemeinen linearen Modell berechnet, um den Beitrag der beteiligten Zufallseffekte zur Varianz der abhängigen Variablen zu ermitteln. Korrelationen wurden je nach Datenverteilung entweder durch den Pearson-Koeffizienten oder den Spearman-Koeffizienten angegeben. Multiple Regressionsanalysen (lineare Regression) wurden mit der schrittweisen Methode durchgeführt. Die logistische Regressionsanalyse wurde genutzt, um Spezifität und Sensitivität von durchgeführten Messungen zu ermitteln. Generell kamen zweiseitige Testverfahren zur Anwendung. Das Signifikanzniveau wurde mit 0,05 festgelegt. Alle Tests wurden mit dem Programm SPSS 9.0[®] für Windows[®] durchgeführt.

3.5 Ethik

Die Ethikkommission der Friedrich-Schiller Universität Jena an der Medizinischen Fakultät hat die in dieser Arbeit dargestellten Studien beraten und erhob aus ethischer Sicht keine Bedenken (Bearbeitungs-Nr. 0567-11/00).

4. Acetylcholinesteraseaktivität im lumbalen und ventrikulären Liquor [137]

Kontrollwerte für die AChE-Aktivität im lumbalen Liquor zwischen $11,3 \pm 0,9$ und $36,7 \pm 3,4$ nmol/min x ml wurden in der Literatur veröffentlicht (siehe Tab. 7). Nicht in jeder der publizierten Studien beachtete man die konventionellen Kriterien, welche es erlauben, eine Liquorprobe als normal einzustufen.

Es war das Ziel der hier vorgestellten Untersuchungen, einen Referenzbereich für die AChE-Aktivität im lumbalen Liquor zu ermitteln. Die Studie sollte weiterhin bestätigen, daß die AChE-Aktivität des Liquors nicht von dem Funktionszustand der Blut-Liquor-Schranke abhängt.

Ventrikuläre Liquorproben von neurochirurgischen Patienten wurden untersucht, um Informationen über die AChE-Aktivität in diesem Liquorkompartiment zu erhalten.

Verschiedene Medikamente, welche häufig bei orthopädischen und neurochirurgischen Patienten Anwendung finden, wurden auf ihre Wirkung hinsichtlich der AChE-Aktivität in vitro an gemischten normalen Liquorproben getestet. Würden ihre therapeutisch bedingten Liquorspiegel nachweisbare Effekte auf das AChE-Testsystem haben, wären gemessene Aktivitäten des Enzyms nicht mehr kausal zu beurteilen.

4.1 Patienten, Parameter, Material und Methoden

Angaben zu den untersuchten Personen finden sich im Abschnitt 3.2.1.

Untersuchte Parameter:

- Acetylcholinesteraseaktivität im lumbalen Liquor ($AChE_{LU}$)
- Acetylcholinesteraseaktivität im ventrikulären Liquor ($AChE_{VE}$)
- Gesamteiweißkonzentration des lumbalen Liquors (GEW_{LU})
- Gesamteiweißkonzentration des ventrikulären Liquors (GEW_{VE})
- Albuminquotient lumbaler Liquor/Serum ($QALB_{LU}$)
- Albuminquotient ventrikulärer Liquor/Serum ($QALB_{VE}$)
- Leukozytenzahl im ventrikulären Liquor (LZ_{VE})
- Weitere Parameter siehe 3.1.3

Charakteristika der Parameter und Analyseverfahren sind im Abschnitt 3.1 beschrieben worden. Statistische Analysen wurden im Abschnitt 3.4 erläutert.

4.2 Ergebnisse der Referenzwertbestimmung für AChE-Aktivität im lumbalen Liquor

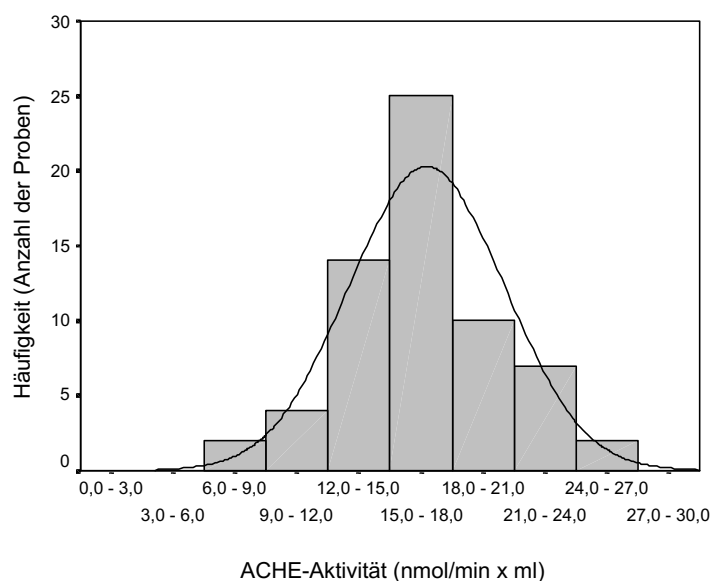
Die Altersverteilung der untersuchten Personen war normal (Kolmogorov-Z; p korrigiert nach Lilliefors): $Z = 0,095$; $p = 0,200$. AChE_{LU} und Alter korrelierten nicht signifikant (Pearson-Korrelationskoeffizient = $-0,178$; $p = 0,159$). Es fanden sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der gemessenen AChE-Aktivität ($p = 0,317$). Deshalb wurden weder Patientenalter noch Geschlecht als signifikante Einflußgrößen bei der Festlegung der Referenzwerte für AChE_{LU} angesehen.

Folgende Parameter waren normal verteilt (Kolmogorov-Z; p korrigiert nach Lilliefors): AChE_{LU} ($Z = 0,091$; $p = 0,200$), GEW_{LU} ($Z = 0,098$; $p = 0,200$), QALB_{LU} ($Z = 0,075$; $p = 0,200$).

Es lag *keine* signifikante Korrelation (Pearson-Korrelationskoeffizient; p) zwischen AChE_{LU} und den Parametern GEW_{LU} ($-0,141$; $p = 0,267$) oder QALB_{LU} ($-0,167$; $p = 0,188$) vor. Die mittlere AChE_{LU} \pm SD betrug $16,8 \pm 3,8$ nmol/min x ml ($7,4 - 25,0$ nmol/min x ml; SEM = $0,5$; 95% Konfidenzintervall des Mittelwertes: untere Grenze: $15,8$ nmol/min x ml; obere Grenze: $17,7$ nmol/min x ml). Das Histogramm für AChE_{LU} wurde in Abb. 6 dargestellt. Aus den Berechnungen ergab sich ein *Referenzbereich der AChE-Aktivität im lumbalen Liquor (Mittelwert \pm 2 SD) von 9,2 bis 24,4 nmol/min x ml*.

Die laboranalytischen Daten für die Parameter GEW_{LU} und QALB_{LU} sowie Angaben zum Alter der untersuchten Personen sind Tab. 8 im Abschnitt 5.2 zu entnehmen.

Abb. 6. Histogramm der AChE-Aktivitäten bei 64 normalen lumbalen Liquorproben (Normalverteilung).



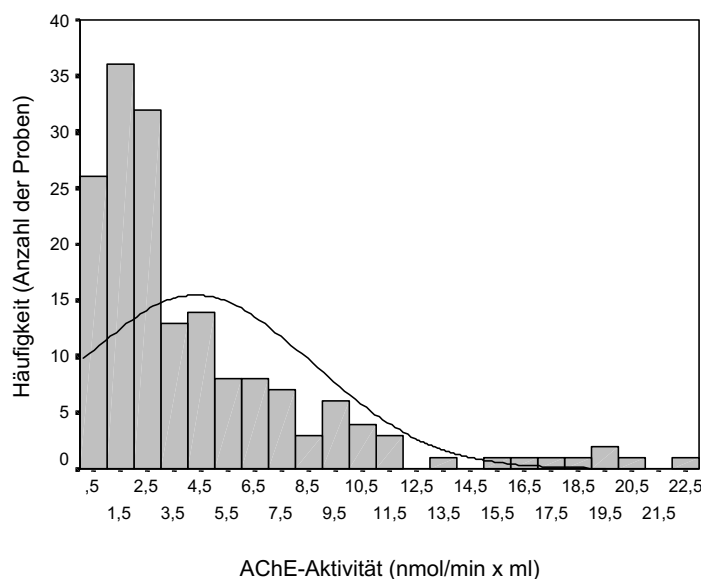
4.3 Ergebnisse der Untersuchungen zur AChE-Aktivität im ventrikulären Liquor

Die laboranalytischen Daten finden sich in Tab. 4 und Tab. 5. Abb. 7 zeigt die Häufigkeitsverteilung der gemessenen ventrikulären AChE-Aktivitäten. In Abb. 8 wird die mittlere AChE_{VE} (95% Konfidenzintervall des Mittelwertes) für die jeweils assoziierte Erkrankung dargestellt. Die Untersuchung aller 169 ventrikulären Liquorproben erbrachte folgende Resultate: mittlere AChE_{VE} ± SEM = 4,3 ± 0,34 nmol/min x ml (0,1 - 22,7 nmol/min x ml; 95% Konfidenzintervall des Mittelwertes: untere Grenze: 3,6 nmol/min x ml; obere Grenze: 5,0 nmol/min x ml).

Die Daten für AChE_{VE}, GEW_{VE}, QALB_{VE}, LZ_{VE} und das Patientenalter waren nicht normal verteilt. Es zeigten sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bezüglich des Parameters AChE_{VE} ($p = 0,308$). AChE_{VE} *korrelierte signifikant* mit den Meßgrößen (Spearman-Korrelationskoeffizient; p) GEW_{VE} (0,57; $p < 0,001$) und QALB_{VE} (0,50; $p < 0,001$). AChE_{VE} und Alter korrelierten nicht signifikant (Spearman-Korrelationskoeffizient = 0,14; $p = 0,077$). Die multiple Regressionsanalyse (schrittweise Methode) erbrachte folgende Gleichung (ANOVA: $F = 32,6$; $p < 0,001$; $R^2 = 0,166$):

vorhergesagte $AChE_{VE} = 3,17 + 0,00176 \times GEW_{VE}$.

Abb. 7. Histogramm der AChE-Aktivitäten bei 169 ventrikulären Liquorproben von 90 neurochirurgischen Patienten (Normalverteilungskurve angezeigt).



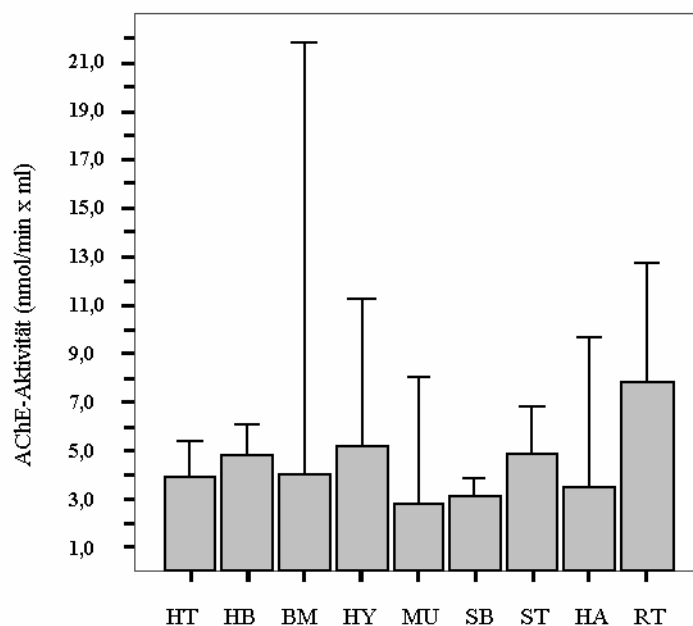
Tab. 4. AChE-Aktivität ($AChE_{VE}$) bei 169 ventrikulären Liquorproben. Untergruppen wurden entsprechend der Diagnosen von 90 neurochirurgischen Patienten definiert. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SEM; (Minimum - Maximum); * bei Untergruppen mit nur zwei Proben sind beide individuellen Daten angegeben; P = Anzahl der Patienten pro Untergruppe; n = Anzahl der Proben pro Untergruppe.

Diagnose	P	n	$AChE_{VE}$ (nmol/min x ml)	
			MW \pm SEM	Min. - Max.
Hirntumor	27	41	$4,0 \pm 0,71$	0,2 - 20,4
Hirnblutung	22	58	$4,8 \pm 0,67$	0,1 - 22,7
bakterielle Meningitis/Enzephalitis *	1	2	2,6; 5,4	-
Hydrozephalus	6	6	$5,2 \pm 2,37$	0,4 - 16,3
Meningitis ungeklärter Ursache *	1	2	2,4; 3,2	-
Subarachnoidalblutung	17	31	$3,1 \pm 0,34$	0,4 - 7,2
Schädel-Hirn Trauma	11	23	$4,9 \pm 0,91$	0,3 - 18,0
Hirnabszeß	3	4	$3,5 \pm 1,93$	1,4 - 9,3
Rückenmarkstumor *	2	2	7,5; 8,2	-

Tab. 5. GEW_{VE} , $QALB_{VE}$ und LZ_{VE} in 169 ventrikulären Liquorproben. Untergruppen wurden entsprechend der jeweiligen Krankheitsgruppe bei 90 neurochirurgischen Patienten definiert. Das Patientenalter wurde angegeben. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SEM; (Minimum - Maximum); * bei Untergruppen mit nur zwei Proben wurden beide individuelle Daten angegeben; P = Anzahl der Patienten pro Untergruppe; n = Anzahl der Proben pro Untergruppe.

Untergruppe	P	n	GEW_{VE} (mg/l)	$QALB_{VE}$	LZ_{VE} (Zellen/ μ l)	Alter (Jahre)
Hirntumor	27	41	406 ± 8 (48 - 2290)	$7,7 \pm 1,4$ (0,6 - 38,0)	26 ± 19 (1 - 800)	53 ± 3 (12 - 86)
Hirnblutung	22	58	831 ± 171 (49 - 8220)	$22,1 \pm 5,4$ (1,2 - 219,6)	87 ± 35 (1 - 1840)	55 ± 3 (28 - 78)
Bakterielle Meningitis/ Enzephalitis *	1	2	5100; 5400	90,9; 100,0	1400; 1600	1/12
Hydrozephalus	6	6	335 ± 119 (55 - 817)	$11,1 \pm 5,3$ (1,3 - 30,0)	4 ± 1 (1 - 8)	34 ± 10 (1/12 - 65)
Meningitis ungeklärter Ursache *	1	2	182; 223	3,1; 3,2	15; 18	28
Subarachnoidal- blutung	17	31	494 ± 76 (64 - 1620)	$9,9 \pm 1,6$ (1,1 - 33,1)	43 ± 13 (1 - 320)	51 ± 3 (26 - 68)
Schädel-Hirn Trauma	11	23	464 ± 117 (61 - 2225)	$8,8 \pm 2,1$ (1,1 - 40,5)	116 ± 82 (1 - 1700)	35 ± 5 (13 - 60)
Hirnabszeß	3	4	378 ± 273 (58 - 1194)	$6,2 \pm 4,2$ (1,0 - 18,7)	8 ± 6 (1 - 26)	57 ± 11 (39 - 76)
Rückenmarks- tumor *	2	2	191; 1120	9,0; 30,0	1; 57	63; 66

Abb. 8. AChE-Aktivitäten im ventrikulären Liquor (Mittelwert + 95% Konfidenzintervall des Mittelwertes) bei Patienten mit Hirntumor (HT), Hirnblutung (HB), bakterieller Meningitis/Enzephalitis (BM), Hydrozephalus (HY), Meningitis ungeklärter Ursache (MU), Subarachnoidalblutung (SB), Schädel-Hirn Trauma (ST), Hirnabszeß (HA), Rückenmarkstumor (RT).



4.4 In vitro-Hemmung der AChE-Aktivität durch ausgewählte Medikamente

Der Hemmeffekt von Medikamenten, welche die AChE-Aktivität in vitro (gemischter normaler lumbaler Liquor) beeinflussen, ist in Tab. 6 dargestellt. Die folgenden Medikamente blieben in Konzentrationen von 10^{-7} mol/l bis 10^{-4} mol/l ohne signifikanten Effekt auf die AChE-Aktivität: Atropin, Cefotaxim, Ceftriaxon, Ciprofloxacin, Dexamethason, Digitoxin, Furosemid, Heparin, Ketamin, Metronidazol, Morphin, Piperacillin, Prednisolon, Suxamethonium, Theophyllin, Thiopental.

Tab. 6. In vitro-Hemmung der AChE-Aktivität von normalen lumbalen Mischliquores durch Neostigmin, Ranitidin, Metoclopramid, Dimetinden, Prilocain, Lidocain, Pancuronium, Verapamil, Droperidol, Omeprazol, Haloperidol, Phenytoin, Bupivacain, Midazolam und Metoprolol (Medikamentenkonzentration im Testsystem: 10^{-7} - 10^{-4} mol/l).

Medikament	Konzentration (mol/l)			
	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
Neostigmin	<5	47	100	100
Ranitidin	5	16	57	85
Metoclopramid	-	9	20	34
Dimetinden	-	<5	16	16
Prilocain	-	<5	10	16
Lidocain	-	<5	6	12
Pancuronium	-	-	10	50
Verapamil	-	-	<5	25
Droperidol	-	-	-	17
Omeprazol	-	-	-	13
Haloperidol	-	-	-	11
Phenytoin	-	-	<5	9
Bupivacain	-	-	<5	<5
Midazolam	-	-	-	7
Metoprolol	-	-	-	7
Prozent Hemmung der AChE-Aktivität				

4.5 Diskussion der Ergebnisse

Im Ergebnis der Studie wurde ein Referenzbereich für die Aktivität der AChE im lumbalen Liquor von 9,2 bis 24,4 nmol/min x ml berechnet. Die Festlegung des Referenzbereiches für die AChE-Aktivität im lumbalen Liquor war methodisch problematisch, da zwischen der Enzymaktivität und konventionellen Liquorparametern kein direkter Zusammenhang besteht. Über 80% des Gesamteiweißes und 100% des Albumins, welche im Liquor nachgewiesen werden können, erreichen diesen über die Blut-Liquor-Schranke. AChE jedoch diffundiert frei in das Liquorkompartiment. Um eine Liquorprobe hinsichtlich der AChE-Aktivität als normal bezeichnen zu können, wäre ein anderes Protein neuronaler Herkunft als Bezugsparameter notwendig. Dieses Protein müsste ebenfalls den Liquorraum erreichen, ohne vorher eine morphologische Schranke zu passieren. Da derartige Proteine gegenwärtig nicht in der Routineanalytik des

Liquor cerebrospinalis bestimmt werden, mußte die Auswahl von normalen Proben auf konventionellen Normalitätskriterien basieren. Diese schließen neben einer unauffälligen Klinik und normaler Blut-Serumdiagnostik auch normale Liquordaten ein.

Das Proteinäquivalent gemessener AChE-Konzentrationen trägt nicht wesentlich zur ermittelten Gesamteiweißkonzentration des Liquors bei. Wegen der hohen molekularen Wechselzahl (Aktivitätskonstante) liegt selbst bei hohen Aktivitäten die Proteinmasse der AChE unter 0,1 mg in einem Liter Liquor. Selbst eine zehnfache Aktivitätserhöhung des Enzyms spiegelt sich deshalb nicht in einer mit Routinemethoden meßbaren Veränderung der Gesamteiweißkonzentration wider.

Im Vergleich zu publizierten Kontrollwerten der AChE-Aktivität ordnet sich der ermittelte Referenzbereich in der in Tab. 7 gezeigten Weise ein.

Tab. 7. Publikationen mit Angaben zu mittleren Liquoraktivitäten der AChE bei normalen Kontrollgruppen, Testverfahren, Anzahl der Proben (n). * alle Einheiten wurden in nmol/min x ml konvertiert; ** keine weiteren Angaben aus der Literaturquelle verfügbar

ACHE_{LU}			
Mittelwert ± SD	n	Literatur	Testverfahren
(nmol/min x ml)*			
11,3 ± 0,9	40	Singer et al. [234]	radioenzymatisch
12,6 ± 2,1	24	Kawakatsu et al. [129]	photometrisch
13,5 ± 4,7	9	Manyam et al. [168]	photometrisch
16,8 ± 3,8	64	Kluge et al. [137]	photometrisch
17,1 ± 1,9	11	Arendt et al. [12]	photometrisch
17,5 ± 4,1	7	Johnson & Domino [122]	radiochemisch
19,1 ± 5,6	26	Atack et al. [16]	photometrisch
19,2 ± 2,3	12	Appleyard et al. [8]	photometrisch
19,9 ** (8,1-30,6)	8	Rasmussen et al. [207]	Immunoassay
23,7 ± 0,9	11	Gomez et al. [94]	photometrisch
23,9 ± 7,1	17	Sirviö et al. [236]	photometrisch
24,9 ± 6,1	14	Hartikainen et al. [108]	photometrisch
25,2 ± 10,8	10	Kumar et al. [151]	radioenzymatisch
25,5 ± 6,4	33	Hartikainen et al. [107]	photometrisch
25,8 ± 10,7	32	Elble et al. [79]	radioenzymatisch
26,9 ± 7,4	9	Hartikainen et al. [108]	photometrisch
36,7 ± 3,4	20	Wester et al. [273]	photometrisch

Analytische Methoden sind offenbar nicht für abweichende Angaben der AChE-Aktivität verantwortlich, da in den veröffentlichten Studien etablierte konventionelle photometrische und radiochemische/-enzymatische Techniken verwendet wurden. Die Unterschiede der gemessenen Enzymaktivitäten beruhen wahrscheinlich auf der Auswahl der Kontrollproben. Neben der Wahl offenbar klinisch gesunder Kontrollpersonen sollte auch die Normalität der Blut- und Liquorbefunde (gemessen an konventionellen Kriterien) gewährleistet sein.

Die Korrelationsanalyse zeigte, daß die Aktivität des normalen lumbalen Liquors in keiner direkten Beziehung zum Albuminquotienten Liquor/Serum steht. Dieser Befund beweist die vorab getroffene Aussage, daß die AChE-Aktivität *nicht* von der Funktion der Blut-Liquor-Schranke abhängt. Der Befund stützt ebenfalls die These, daß die im lumbalen Liquor gemessene AChE-Aktivität den Zustand der sekretorischen Funktion enzymproduzierender ZNS-Zellen (wahrscheinlich in erster Linie neuronaler Zellen) widerspiegelt. Funktionelle Alterationen dieser Zellelemente lassen sich deshalb durch meßbare Änderungen der AChE-Aktivität im Liquor charakterisieren.

Vergleichbare Schlußfolgerungen sind für die unter den vorliegenden Bedingungen entnommenen ventrikulären Liquores wegen der möglicherweise verfälschenden Elemente rein spekulativ. Jede ventrikuläre Liquorprobe, welche durch ein Drainagesystem oder während eines operativen Eingriffes entnommen wird, kann bezüglich ihrer stofflichen Zusammensetzung nicht als normal betrachtet werden. Man weiß nicht, ob die chirurgischen Prozeduren und Ventrikeldrainagen am Lebenden bereits zu substantiellen Veränderungen im entnommenen ventrikulären Liquor führen.

Die Mehrzahl der in dieser Studie analysierten ventrikulären Liquorproben zeigte AChE-Aktivitäten unter 4 nmol/min x ml (Abb. 7). Tornel et al. [253] fanden Aktivitäten unter 5 nmol/min x ml bei 9 ventrikulären „Kontrollen“ (normale Gesamteiweißkonzentration). Haber und Grossmann [104] berechneten für 6 Patienten mit „minimaler Pathologie“ die mittlere ventrikuläre AChE-Aktivität mit 1,33 nmol/min x ml (mittlere Gesamteiweißkonzentration = 240 mg/l). Appleyard et al. [7] und Atack et al. [18] fanden AChE-Aktivitäten von 5 - 18 nmol/min x ml (n = 18) bzw. $24,6 \pm 1,7$ nmol/min x ml (n = 3) in post mortem Liquores (Appleyard [7]: mittlere Gesamteiweißkonzentration > 6000 mg/l). Die

hohen Enzymaktivitäten in post mortem Proben sind wahrscheinlich durch autolytische Prozesse bedingt.

Trotz der geäußerten Vorbehalte gegen die „Normalität“ gewonnener ventrikulärer Liquores kann durch die ermittelten Wertebereiche ein ventriculo-lumbaler Gradient für AChE von ca. 1 : 3 angenommen werden. Ein beträchtlicher Zustrom des Enzyms innerhalb der nicht-ventrikulären Liquorräume wird damit dokumentiert. Bei lumbal punktierten Patienten mit Hydrocephalus communicans findet sich in aufsteigend fraktionierten Proben (entnommenes Gesamtvolumen 30 ml in Portionen zu je 5 ml) eine thorakolumbale Zunahme der AChE-Aktivität von 5 - 10 % (Kluge H; persönliche Mitteilung).

Die AChE-Aktivität im ventrikulären Liquor korrelierte positiv mit der Gesamteiweißkonzentration. Diese Beziehung wurde für den lumbalen Liquor nicht beobachtet. Eine gestörte Blut-Liquor-Schrankenfunktion scheint als Ursache für die beobachtete Korrelation im ventrikulären Liquor *unwahrscheinlich*. Eine Schrankenfunktionsstörung würde nur zu einer Erhöhung der Gesamteiweißwerte im ventrikulären Liquor führen, jedoch die AChE-Aktivität unverändert belassen: Da die freien AChE-Aktivitäten im normalen Serum höchstens denen des normalen ventrikulären Liquors ähneln [137] und niedriger als die des normalen lumbalen Liquors sind, würde sich die AChE-Aktivität beispielsweise bei Einstrom eines Serumäquivalentes von 0,1 ml auf 5 ml ventrikuläres Liquorvolumen nur um einen unterhalb der methodischen Erfassungsgrenze liegenden Wert (unter 2%) erhöhen, während der Proteinwert um etwa das 10- bis 15-fache ansteige. Im lumbalen Liquor macht sich ein solcher Einstrom wegen der Verdünnung auf 120 - 150 ml Volumen hinsichtlich der AChE-Aktivität noch viel weniger bemerkbar, wäre aber als Gesamtproteinerhöhung um mehr als 10% noch deutlich meßbar. Die im nicht-blutigen ventrikulären Liquor beobachtete Korrelation zwischen AChE-Aktivitäten und Gesamtprotein ist also scheinbar und nur über einen parallelen Einstrom von AChE und anderen, massenmäßig stärker sezernierten Proteinen aus dem periventrikulären Hirnparenchym zu erklären.

Eine gestörte Blut-Liquor-Schrankenfunktion kann jedoch prinzipiell parallel zu einer alterierten AChE-Sekretion aus enzymfreisetzenden Zellen vorliegen. Diese

Feststellung ließ sich durch den in der Mehrzahl ventrikulärer Liquorproben gemessenen erhöhten Albuminquotienten Liquor/Serum (Tab. 5) untermauern.

In vitro-Hemmversuche an ausgewählten Pharmaka zeigten, daß mögliche Reste im Liquor keinen Einfluß auf die gemessene Enzymaktivität im AChE-Testsystem haben. *Ranitidin* (bei Patienten der vorliegenden Studien eingesetzt) muß eine Liquorkonzentration von 10^{-7} mol/l überschreiten, um eine inhibitorische Wirkung auf die AChE-Aktivität ausüben zu können (Tab. 6). Gleiches gilt für Neostigmin, wobei dieses Medikament nur bei einzelnen neurochirurgischen Patienten eingesetzt wurde (ausschließlich für ventrikuläre Liquorproben relevant). Bei allen anderen untersuchten Pharmaka liegt die erforderliche Liquorkonzentration höher.

Die im Liquor nachweisbare Konzentration nach systemischer Gabe therapeutischer Dosierungen von Ranitidin wurde mit $0,3 - 1,3 \times 10^{-7}$ mol/l [124] angegeben. Die zu erwartenden Pharmakonkonzentrationen liegen in Liquorproben folglich (außer im Falle einer nicht zu erwartenden Überdosierung von Ranitidin) unter der für mögliche AChE-Hemmung erforderlichen Grenze.

Untersuchungen von Hartvig et al. [110] zeigten, daß bei systemischer Applikation von Neostigmin Serumkonzentrationen zwischen 1 und 10 ng/ml gemessen werden. Die Serumkonzentration liegt also bei normaler Dosierung des Medikamentes bei 10^{-9} bis 10^{-8} mol/l. Obwohl Liquorkonzentrationen des Neostigmins nach systemischer Verabreichung bisher nicht bestimmt wurden, kann man annehmen, daß diese unter der Serumkonzentration liegen.

Die vorliegenden *in vitro*-Ergebnisse erlauben keine Rückschlüsse bezüglich einer möglichen Hemmwirkung der getesteten Medikamente auf die *in vivo*-Aktivität und die zelluläre Sekretion des Enzyms AChE. Ebenso wenig kann aus den vorliegenden Ergebnissen eine Bewertung der Pharmakonwirkung auf membrangebundene AChE vorgenommen werden.

Pharmakologische Untersuchungen im Zusammenhang mit Medikamentenwirkungen auf die Cholinesteraseaktivitäten haben gezeigt, daß *in vitro-Bupivacainkonzentrationen* zwischen 0,1 und 0,5 mmol/l eine maximale BChE-Hemmung verursachen, die AChE-Aktivität jedoch nur minimal beeinflussen (Tab. 6, Anhang 2). Bupivacain bot sich somit als möglicher nicht giftiger Inhibitor der BChE-Aktivität in einem Differenzierungsverfahren zur

Bestimmung der AChE-Aktivität im Liquor (Bupivacain-Hemmtest [135]) an. Detaillierte Erläuterungen zu Bupivacaineffekten wurden im Kapitel 7 und in Anhang 2 gegeben.

4.6 Zusammenfassung

Die Analyse von 64 normalen Liquorproben ergab einen Referenzbereich der AChE-Aktivität im lumbalen Liquor von 9,2 bis 24,4 nmol/min x ml.

Die AChE-Aktivität des Liquors ist unabhängig vom funktionellen Zustand der Blut-Liquor-Schranke.

Die Ergebnisse der Studie bestätigen, daß die AChE-Aktivität des lumbalen Liquors als ein Maß für die sekretorische Aktivität von nervalen Zellen genutzt werden kann.

Die überwiegende Mehrzahl der in 169 ventrikulären Liquorproben neurochirurgischer Patienten ermittelten AChE-Aktivitäten lag in einem Bereich < 4 nmol/min x ml.

Ein ventriculo-lumbaler AChE-Aktivitätsgradient von ca. 1 : 3 ist unter physiologischen Bedingungen anzunehmen.

Mögliche Restmengen untersuchter Medikamente in den Liquorproben haben keinen Einfluß auf die AChE-Aktivität des Testsystems.

5. Butyrylcholinesteraseaktivität im lumbalen und ventrikulären Liquor [136]

Das Ziel der Studie war es, einen Referenzbereich für die BChE-Aktivität im lumbalen Liquor zu ermitteln.

Neue Erkenntnisse über die Herkunft des Liquorenzyms sollten gewonnen werden. Der Einfluß der Blut-Liquor-Schrankenfunktion auf die Liquoraktivität der BChE war zu beurteilen.

Untersuchungen ventrikulärer Proben von neurochirurgischen Patienten sollten Informationen über BChE-Aktivitäten im ventrikulären Kompartiment vermitteln.

Analog zu den im vorangegangenen Kapitel vorgestellten Untersuchungen wurden Medikamente, welche häufig bei orthopädischen und neurochirurgischen Patienten Anwendung finden, auf ihre Wirkung hinsichtlich der BChE-Aktivität in vitro an gemischten normalen Liquorproben getestet. Entsprechende Tests wurden ebenfalls an Serumproben durchgeführt.

5.1 Patienten, Parameter, Material und Methoden

Personen entsprechen denen der Untersuchungen zur Referenzwertbestimmung der AChE-Aktivität (Kapitel 4). Detaillierte Angaben sind dem Abschnitt 3.2.1 zu entnehmen.

Untersuchte Parameter:

- Butyrylcholinesteraseaktivität im lumbalen Liquor (BChE_{LU})
- Butyrylcholinesteraseaktivität im ventrikulären Liquor (BChE_{VE})
- Butyrylcholinesteraseaktivität im Serum (BChE_{SE})

Die folgenden Parameter waren bereits in den Studien zur Referenzwertbestimmung der AChE-Aktivität (Kapitel 4) bestimmt worden und wurden nunmehr bezüglich ihrer Beziehungen zur BChE-Aktivität analysiert:

- Acetylcholinesteraseaktivität im lumbalen Liquor (AChE_{LU})
- Acetylcholinesteraseaktivität im ventrikulären Liquor (AChE_{VE})
- Gesamteiweißkonzentration des lumbalen Liquors (GEW_{LU})
- Gesamteiweißkonzentration des ventrikulären Liquors (GEW_{VE})
- Albuminquotient lumbaler Liquor/Serum (QALB_{LU})
- Albuminquotient ventrikulärer Liquor/Serum (QALB_{VE})
- Leukozytenzahlen im ventrikulären Liquor (LZ_{VE})
- Weitere Parameter siehe 3.1.3

Charakteristika der Parameter und Analyseverfahren siehe Abschnitt 3.1; statistische Analysen siehe Abschnitt 3.4.

5.2 Ergebnisse der Referenzwertbestimmung für BChE-Aktivität im lumbalen Liquor

Die BChE-Aktivitäten im lumbalen Liquor und im Serum waren normal verteilt (Kolmogorov-Smirnov-Z; p korrigiert nach Lilliefors): BChE_{LU} (Z = 0,066; p = 0,200), BChE_{SE} (Z = 0,079; p = 0,200). Zur Datenverteilung für Alter, AChE_{LU},

GEW_{LU} und QALB_{LU} siehe Abschnitt 4.2. Das Histogramm der BChE-Aktivitäten im lumbalen Liquor findet sich in Abb. 9. Die Ergebnisse der Laboranalyse normaler Liquores sind in Tab. 8 zusammengefaßt.

Wir fanden keine geschlechtsspezifischen Unterschiede hinsichtlich BChE_{LU} ($p = 0,957$). Deshalb wurde das Geschlecht der untersuchten Personen nicht in die folgenden Analysen einbezogen.

Die mittlere BChE_{LU} \pm SD betrug $11,2 \pm 2,9$ nmol/min x ml (6,5 - 19,9 nmol/min x ml; SEM = 0,4; 95% Konfidenzintervall des Mittelwertes: untere Grenze: 10,5 nmol/min x ml; obere Grenze: 12,0 nmol/min x ml). Aus den vorliegenden Daten ergibt sich ein *Referenzbereich der BChE-Aktivität im lumbalen Liquor* (Mittelwert \pm 2 SD) von 5,4 bis 17,0 nmol/min x ml.

Signifikante Korrelationen (Pearson-Korrelationskoeffizient; p) bestanden zwischen BChE_{LU} und AChE_{LU} (0,669; $p < 0,001$) und zwischen BChE_{LU} und dem Alter der untersuchten Personen (-0,323; $p = 0,009$).

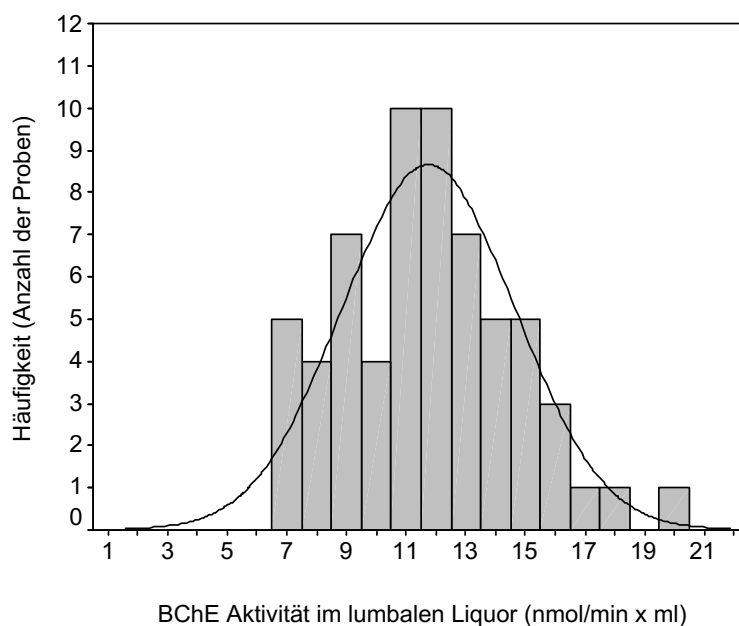
Die multiple Regressionsanalyse (schrittweise Methode) ergab folgende Gleichung (ANOVA: $F = 23,0$; $p < 0,001$; $R^2 = 0,535$): vorhergesagte BChE_{LU} = $2,846 + 0,466 \times \text{AChE}_{\text{LU}} + 0,00032 \times \text{BChE}_{\text{SE}} - 0,0505 \times \text{Alter}$.

Standardisierte beta-Koeffizienten: AChE_{LU}: 0,598; BChE_{SE}: 0,216; Alter: -0,259.

Tab. 8. Laboranalyse von 64 normalen lumbalen Liquorproben: Mittelwerte (MW) \pm SD; (Minimum - Maximum).

Parameter	MW \pm SD	Min. - Max.
GEW _{LU} (mg/l)	262 ± 45	153 - 344
QALB _{LU}	$3,9 \pm 0,9$	1,6 - 5,5
AChE _{LU} (nmol/min x ml)	$16,8 \pm 3,8$	7,4 - 25,0
BChE _{SE} (nmol/min x ml)	7738 ± 1977	3055 - 12825
Alter (Jahre)	$38,1 \pm 15$	16 - 79

Abb. 9. Histogramm der BChE-Aktivitäten bei 64 normalen lumbalen Liquorproben (Normalverteilung).



5.3 Ergebnisse der Untersuchungen zur BChE-Aktivität im ventrikulären Liquor

Die überwiegende Mehrzahl der ventrikulären BChE-Aktivitäten lag *unter 6 nmol/min x ml*. Bei der Untersuchung aller ventrikulären Liquorproben ermittelten wir für BChE_{VE} folgende Daten: Mittelwert \pm SEM = $33,6 \pm 6,6$ nmol/min x ml (0,1 - 592,4 nmol/min x ml; 95% Konfidenzintervall des Mittelwertes: untere Grenze: 20,5 nmol/min x ml; obere Grenze: 46,6 nmol/min x ml). Die Histogramme für BChE_{VE} sind in Abb. 10 und 11 dargestellt. Abb. 12 verdeutlicht die mittleren BChE-Aktivitäten im ventrikulären Liquor für jede Untergruppe der neurochirurgischen Patienten, Tab. 9 zeigt die detaillierten Meßergebnisse.

Die Daten des Parameters BChE_{VE} waren nicht normal verteilt. Für BChE_{SE} fanden wir eine Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Z = 0,061; p korrigiert nach Lilliefors = 0,200). Die Ergebnisse der Laboranalysen und weitere Angaben zur Datenverteilung bzw. zum Patientenalter sind dem Abschnitt 4.3 (Tab. 4 und 5) sowie der Tab. 9 zu entnehmen. Es existierten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede der BChE_{VE} ($p = 0,483$). BChE_{VE} korrelierte signifikant mit den Parametern (Spearman-Korrelationskoeffizient; p) GEW_{VE} (0,91; $p < 0,001$),

QALB_{VE} (0,85; $p < 0,001$), AChE_{VE} (0,57; $p < 0,001$) und BChE_{SE} (0,22; $p = 0,004$). BChE_{VE} korrelierte nicht signifikant mit dem Alter der Patienten (Spearman-Korrelationskoeffizient = 0,13; $p = 0,080$). Die multiple Regressionsanalyse ergab folgende Gleichung (ANOVA: $F = 170,9$; $p < 0,001$; $R^2 = 0,51$): vorhergesagte BChE_{VE} = $-3,884 + 0,0593 \times \text{GEW}_{VE}$.

Abb. 10. Histogramm der BChE-Aktivitäten bei 169 ventrikulären Liquorproben von 90 neurochirurgischen Patienten. In der Abb. wurden nur Aktivitäten bis zu 50 nmol/min x ml dargestellt (Normalverteilungskurve).

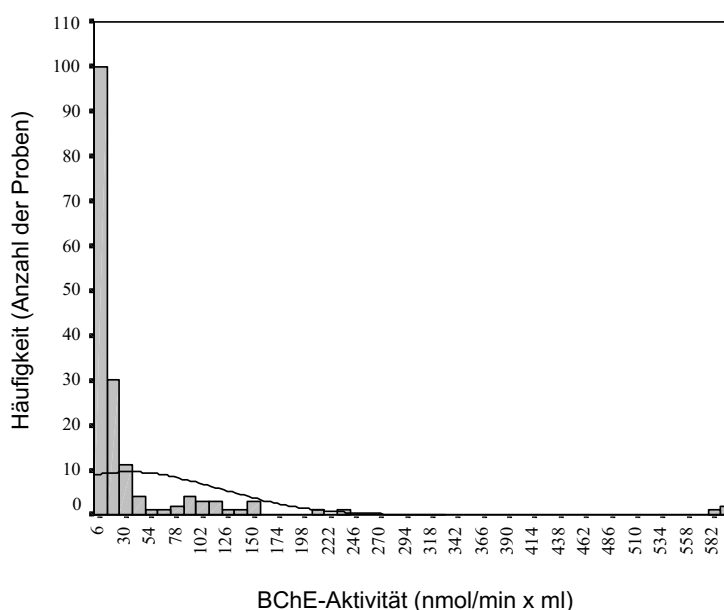


Abb. 11. Ausschnitt aus dem Histogramm in Abb. 10. BChE-Aktivitäten wurden nur bis 30 nmol/min x ml dargestellt (Normalverteilungskurve bzw. -gerade). Die Mehrzahl der in der Studie gemessenen ventrikulären BChE-Aktivitäten lag unter 6 nmol/min x ml.

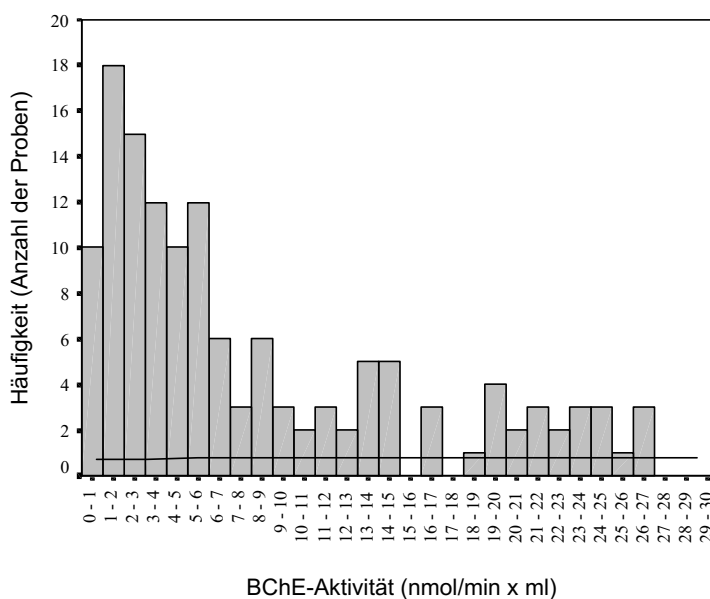
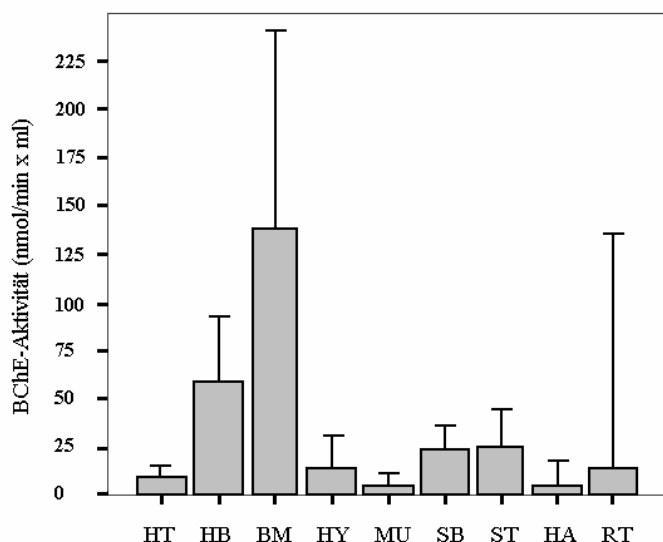


Abb. 12. BChE-Aktivitäten im ventrikulären Liquor (Mittelwert + 95% Konfidenzintervall des Mittelwertes) bei Patienten mit Hirntumor (HT), Hirnblutung (HB), bakterielle Meningitis/Enzephalitis (BM), Hydrozephalus (HY), Meningitis ungeklärter Ursache (MU), Subarachnoidalblutung (SB), Schädel-Hirn Trauma (ST), Hirnabszeß (HA), Rückenmarkstumor (RT).



Tab. 9. BChE_{VE}, BChE_{SE} von 169 ventrikulären Liquorproben. Untergruppen sind entsprechend der einzelnen Diagnosen bei 90 neurochirurgischen Patienten definiert. P: Anzahl der Patienten, n: Anzahl der Liquorproben. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SEM (Minimum - Maximum). * bei Untergruppen mit nur zwei Proben sind beide individuellen Daten angegeben.

Untergruppe	P	n	BChE _{VE} (nmol/min x ml)	BChE _{SE} (nmol/min x ml)
Hirntumor	27	41	10,0 \pm 2,2 (0,1 - 76,4)	4750 \pm 264 (1645 - 7930)
Hirnblutung	22	58	59,0 \pm 17,5 (0,1 - 592,4)	4009 \pm 168 (1690 - 6630)
Bakterielle Meningitis/ Enzephalitis *	1	2	130,0; 146,3	5200; 5280
Hydrozephalus	6	6	14,1 \pm 6,6 (1,3 - 45,5)	4156 \pm 715 (1846 - 6695)
Meningitis ungeklärter Ursache *	1	2	4,9; 5,8	8236; 3334
Subarachnoidalblutung	17	31	24,5 \pm 6,5 (0,3 - 148,0)	4568 \pm 349 (1593 - 9880)
Schädel-Hirn Trauma	11	23	26,7 \pm 9,0 (0,3 - 152,4)	4287 \pm 253 (1430 - 6435)
Hirnabszeß	3	4	5,8 \pm 3,6 (0,3 - 16,1)	4160 \pm 597 (2763 - 5590)
Rückenmarkstumor *	2	2	4,1; 23,4	1495; 5430

5.4 In vitro-Hemmung der BChE-Aktivität durch ausgewählte Medikamente

Der Hemmeffekt von Medikamenten, welche die BChE-Aktivität in vitro beeinflussten, ist in Tab. 10 für gemischte normale lumbale Liquorproben und in Tab. 11 für gemischte normale Serumproben dargestellt. Die folgenden Medikamente blieben in Konzentrationen von 10^{-7} mol/l bis 10^{-4} mol/l *ohne* signifikanten Effekt auf die BChE-Aktivität aus Liquor und Serum: Atropin, Cefotaxim, Ceftriaxon, Ciprofloxacin, Dexamethason, Digitoxin, Furosemid, Heparin, Ketamin, Metronidazol, Morphin, Piperacillin, Prednisolon, Suxamethonium, Theophyllin, Thiopental.

Tab. 10. In vitro-Hemmung der BChE-Aktivität von normalen lumbalen Mischliquores durch Pancuronium, Metoclopramid, Neostigmin, Dimetinden, Prilocain, Lidocain, Ranitidin, Verapamil, Midazolam, Metoprolol, Droperidol, Omeprazol und Haloperidol (Medikamentenkonzentration im Testsystem: 10^{-7} - 10^{-4} mol/l). * Konzentrationen von 10^{-4} mol/l konnten aus dem kommerziell verfügbaren Pharmakon nicht hergestellt werden.

Medikament	Konzentration (mol/l)			
	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
Pancuronium	16	62	87	100
Metoclopramid	-	7	43	88
Neostigmin	-	<5	18	*
Dimetinden	-	-	20	72
Prilocain	-	-	13	59
Lidocain	-	-	15	54
Ranitidin	-	-	<5	31
Verapamil	-	-	<5	27
Midazolam	-	-	<5	14
Metoprolol	-	-	<5	7
Droperidol	-	-	-	12
Omeprazol	-	-	-	22
Haloperidol	-	-	-	13
Prozent Hemmung der BChE-Aktivität				

Tab. 11. In vitro-Hemmung der BChE-Aktivität von normalen Serumproben durch Pancuronium, Metoclopramid, Dimetinden, Neostigmin, Prilocain, Lidocain, Ranitidin, Verapamil, Droperidol, Haloperidol, Midazolam, Metoprolol und Omeprazol (Medikamentenkonzentration im Testsystem: 10^{-7} - 10^{-4} mol/l). * Konzentrationen von 10^{-4} mol/l konnten aus dem kommerziell verfügbaren Pharmakon nicht hergestellt werden.

Medikament	Konzentration (mol/l)			
	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
Pancuronium	12	60	91	100
Metoclopramid	-	6	44	87
Dimetinden	-	<5	21	73
Neostigmin	-	-	16	*
Prilocain	-	-	14	58
Lidocain	-	-	14	54
Ranitidin	-	-	<5	28
Verapamil	-	-	<5	25
Droperidol	-	-	<5	14
Haloperidol	-	-	-	14
Midazolam	-	-	-	13
Metoprolol	-	-	-	9
Omeprazol	-	-	-	5
Prozent Hemmung der BChE-Aktivität				

Die Untersuchungen zu Effekten von Bupivacain auf Cholinesteraseaktivitäten in Liquor und Serum wurden detailliert im Kapitel 7 und im Anhang 2 dargestellt.

5.5 Diskussion der Ergebnisse

Im Ergebnis der Untersuchungen wurde der Referenzwert für die BChE-Aktivität im lumbalen Liquor zwischen 5,4 und 17,0 nmol/min x ml bestimmt. Methodische Unterschiede der Testsysteme sind die Hauptursache für *fehlende Vergleichbarkeit* veröffentlichter Kontrolldaten zur BChE-Aktivität im Liquor: Das Enzym hat eine *niedrige* Substratspezifität. Mindestens 4 verschiedene Substrate wurden in publizierten Untersuchungen zur Aktivitätsbestimmung genutzt [251]. Testverfahren, welche das Substrat Acetylthiocholin verwenden, erfordern die parallele Hemmung der AChE-Aktivität in Flüssigkeiten, die beide Cholinesterasen beinhalten. Das Inhibitor-freie Verfahren zur Bestimmung der

AChE und BChE-Aktivitäten im Liquor vermeidet diese Probleme [134]. Den Ergebnissen der vorliegenden Studien zufolge (Abschnitt 3.1.1 und Anhang 1) ist Butyrylthiocholin als das geeignetste Substrat zur Bestimmung der BChE-Aktivität anzusehen.

Die Testendkonzentrationen der verwendeten Substrate schwanken in den publizierten Studien beträchtlich. Die BChE-Kinetik zeigt generell *keine komplette* Substratsättigung innerhalb der gemessenen Konzentrationsgrenzen. Somit sind die unterschiedlichen Kontrollaktivitäten verständlich. Entsprechend der im Anhang 1 dargestellten Erkenntnisse (Abb. A1.1 und A1.2) kann eine *Annäherung* an die Substratsättigung mit einer Butyrylthiocholinkonzentration von 5 mmol/l erreicht werden. Die mit dieser Substratendkonzentration gemessene BChE-Aktivität ist nahezu doppelt so hoch wie diejenige, welche mit 0,5 mmol/l Substratendkonzentration ermittelt wurde (Abb. A1.2). Die Aktivitätserhöhung zwischen 3 mmol/l und 5 mmol/l beträgt nur noch 5% . Autoren, welche Testkonzentrationen von 0,5 mmol/l Butyrylthiocholin verwendeten, fanden mittlere Enzymaktivitäten (\pm SEM) von $4,9 \pm 0,8$ nmol/min x ml [12] und $9,1 \pm 3,1$ nmol/min x ml [16]. Kawakatsu [129], der Acetylthiocholin in einer Testkonzentration von 1 mmol/l nutzte, fand eine mittlere Kontrollaktivität (\pm SD) von $4,3 (\pm 1,6)$ nmol/min x ml.

Nicht in allen publizierten Studien wurde bei der Auswahl von Kontrollproben auf die Verwendung normaler Liquores (hinsichtlich der Routineparameter) geachtet. Personen, welche nach klinischen Gesichtspunkten als gesund einzuschätzen sind, zeigen nicht in jedem Falle auch normale konventionelle Liquorparameter. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Auswahl der lumbalen Liquorproben zur Bestimmung der Referenzwerte für die BChE-Aktivität äquivalent zur Referenzwertbestimmung der AChE-Aktivität nach normalen klinischen *und* normalen konventionellen Serum- und Liquordaten vorgenommen.

Für den ventrikulären Liquor konnte kein Normalbereich der BChE-Aktivität festgelegt werden. Die Gründe sind im Abschnitt 4.5 erläutert worden. Man weiß nicht sicher, ob die gemessenen Parameter im Ventrikel durch zugrunde liegende Pathologie, chirurgische Manipulation oder Drainagesysteme beeinflusst wurden. Demnach können aus Untersuchungen nur vorläufige Schlußfolgerungen gezogen werden. Die Mehrzahl der untersuchten ventrikulären Liquorproben zeigte jedoch

BChE-Aktivitäten von bis zu 6 nmol/min x ml. Das Histogramm ist in seiner Verteilungskurve nach rechts ausladend (Abb. 10 und 11). Dieses Erscheinungsbild ist typisch für eine Vielzahl an pathologisch veränderten Werten im gesamten Datenpool. Man kann bei den vorliegenden Untersuchungen davon ausgehen, daß ca. 60% der Liquorproben durch eine Blut-Liquor-Schrankenstörung verändert sind ($QALB_{VE} > 4$).

Tornel et al. [253] gaben native ventrikuläre BChE-Aktivitäten zwischen 0 und 6 nmol/min x ml für Patienten mit Hydrozephalus an (mittleres GEW_{VE} ca. 250 mg/l). Haber and Grossman [104] untersuchten 6 Fälle mit “minimaler Pathologie” und fanden Aktivitäten um 7,8 nmol/min x ml (mittleres GEW_{VE} ca. 240 mg/l). Appleyard und McDonald [7] sowie Atack et al. [17] untersuchten die ventrikulären BChE-Aktivitäten an Leichen. Beide Autoren fanden Kontrollaktivitäten von > 20 nmol/min x ml (mittleres GEW_{VE} ca. 6200 mg/l in der Studie von Appleyard und McDonald [7]). Wahrscheinlich sind an Leichen gewonnene Daten nicht für den Lebenden repräsentativ. Unter post mortem Bedingungen sistiert die Liquorzirkulation zwischen dem punktierten Seitenventrikel (Volumen 5 - 7 ml) und anderen Liquorkompartimenten. In dieser Situation genügt bereits ein artifizieller Einstrom von 10 µl Serum in den Ventrikel, um die BChE-Aktivität des Liquors um 10 nmol/min x ml und die GEW_{VE} um 100 mg/l ansteigen zu lassen. Außerdem sind die ventrikulären ependymalen Zilien nach dem Tode noch für ca. 6 Stunden bewegungsaktiv [276] und fächern somit jedes extrazellulär liegende Autolyseprodukt in den Liquor. Post mortem erreichen wahrscheinlich größere Proteinmengen den Liquorraum als beim Lebenden.

Tornel et al. [254] publizierten eine quantitative Analyse zu möglichen Enzymquellen für die gemessene totale BChE-Aktivität im Liquor. Nach ihren Ergebnissen stammen 60% der im lumbalen Liquor von gesunden Kindern nachgewiesenen BChE-Aktivität aus dem Blut, während die restlichen 40% aus dem ZNS freigesetzt würden. In der vorliegenden Studie wurde versucht, den relativen *Einfluß* der *Serum-* bzw. *ZNS-Fraktion* auf die im Liquor gemessene Totalaktivität der BChE durch Korrelations- und multiple Regressionsanalyse darzustellen. Der Zusammenhang zwischen BChE-Aktivität im Liquor und Referenzparametern, die einerseits den Funktionszustand der Blut-Liquor-Schranke (QALB) und andererseits die sekretorische Funktion von ZNS-Zellen

(AChE-Aktivität) darstellen, wurde untersucht. Der hohe Serum/Liquor Gradient der BChE-Aktivität hatte bisher zu der Vermutung geführt, daß die hauptsächliche Enzymquelle für die BChE-Liquoraktivität im Serum zu suchen ist [17]. Die Ergebnisse der Studie von Tornel et al. [254] und die hier dargestellten Berechnungen stellen diese Hypothese in Frage. In normalen lumbalen Liquorproben fand sich eine statistisch signifikante Korrelation der BChE-Aktivität *ausschließlich* mit dem Parameter $AChE_{LU}$. Die multiple Regressionsanalyse bestätigte diesen Befund, wobei zusätzlich eine signifikante Beziehung zwischen Liquor-BChE-Aktivität und Serum-BChE-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Aus diesen Berechnungen kann die Schlußfolgerung abgeleitet werden, daß die BChE-Aktivität im normalen *lumbalen* Liquor entscheidend durch die *Enzymfreisetzung aus ZNS-Zellen* bestimmt wird. Einstrom von BChE aus dem Serum ist unter Normalbedingungen ebenfalls anzunehmen, nimmt jedoch bei normaler Blut-Liquor-Schrankenfunktion eher eine untergeordnete Position ein.

Vergleichbare Berechnungen hinsichtlich ventrikulären Liquors sind spekulativer Natur, da aus oben genannten Gründen artifizielle Serumbeimengungen unter den gegebenen Bedingungen der ventrikulären Probeentnahme nicht ausgeschlossen werden können. Die Korrelationsanalyse erbrachte eine statistisch signifikante positive Beziehung zwischen der im ventrikulären Liquor gemessenen BChE-Aktivität und dem Schrankenparameter $QALB_{VE}$. Ebenso fanden sich signifikante positive Korrelationen zum Parameter $AChE_{VE}$, zur Serum-BChE und zur Gesamteiweißkonzentration des Liquors. Das im Liquor gemessene Gesamteiweiß rekrutiert sich nach bisherigen Erkenntnissen zu 20 - 30% aus Proteinen, die direkt durch das ZNS in den Liquor freigesetzt werden. Die verbleibenden 70 - 80% sollen über die Blut-Liquor-Schranke ultrafiltriert werden. Da diese Angaben nicht eindeutig belegt sind, kann aus der Korrelation zwischen $BChE_{VE}$ und GEW_{VE} keine eindeutige Schlußfolgerung gezogen werden. Die multiple Regressionsanalyse bestätigte die aus der Korrelationsanalyse gewonnenen Erkenntnisse. Es ist folglich sehr wahrscheinlich, daß im (eventuell pathologisch veränderten) *ventrikulären* Liquor der Enzymeinstrom aus dem *Serum* relativ *mehr* zur totalen gemessenen BChE-Aktivität beiträgt als im normalen lumbalen Liquor. Die Ursache kann einerseits in der Natur der Produktion des Primärliquors als Ultrafiltrat im Seitenventrikel zu suchen sein, andererseits ist eine Blut-

Liquor-Schrankenstörung in den untersuchten Fällen nicht auszuschließen. Man sollte ebenfalls bedenken, daß die (BChE freisetzende) ventrikuläre Hirnoberfläche relativ klein ist im Vergleich zu den potentiell BChE-sezernierenden nervalen Oberflächen außerhalb der Ventrikelräume. Eine Anreicherung von aus dem ZNS freigesetztem Enzym auf dem Wege des Liquors vom Seitenventrikel zum Lumbalsack ist anzunehmen (*ventriculo-lumbaler Aktivitätsgradient ca. 1 : 2*). Die Physiologie der normalen BChE-Freisetzung in den Liquor ließe sich besser aufdecken, wenn es gelänge, nativen humanen ventrikulären Liquor von gesunden Personen zu analysieren. Die ethischen Grenzen sind offensichtlich.

In vitro-Hemmversuche ausgewählter Medikamente veranschaulichten, daß eventuell vorhandene Restmengen in Liquores keinen Einfluß auf die gemessene BChE-Aktivität im Testsystem haben. Pancuronium, Metoclopramid und Neostigmin müssen eine Liquor- bzw. Serumkonzentration von 10^{-7} mol/l überschreiten, um eine inhibitorische Wirkung auf die BChE-Aktivität ausüben zu können (Tab. 10 und 11). Bei allen anderen untersuchten Pharmaka liegt die erforderliche Konzentration höher.

Pancuronium wurde bei keinem der untersuchten Patienten eingesetzt, weshalb eine Beeinflussung des Testsystems für die vorgestellten Studien durch dieses Pharmakon ausgeschlossen werden kann. Für Neostigmin, welches nur bei einzelnen neurochirurgischen Patienten (ventrikuläre Liquorproben) Verwendung fand, gelten die im Abschnitt 4.5 getroffenen Erläuterungen.

Metoclopramid verursacht nach Angaben von Graham und Crossley [96] in Konzentrationen von $1,0 - 1,9 \times 10^{-6}$ mol/l in vitro eine 50%-ige Hemmung der Aktivität des Serumenzyms. Eine eben solche in vitro-Hemmung fanden Kao and Tellez [127] bei einer in vitro Metoclopramidkonzentration von $3,16 \times 10^{-7}$ mol/l. Nach Angaben von Driver et al. [76] bewirken therapeutische Dosierungen von intravenös appliziertem Metoclopramid keine Hemmung der AChE-Aktivität im Liquor von Frauen, welche anlässlich einer Spinalanästhesie (operative Entbindung) punktiert worden waren. Therapeutische Dosierungen von Metoclopramid induzieren eine Serumkonzentration von $0,05 - 0,15 \mu\text{g/ml}$ ($1,41 - 4,23 \times 10^{-7}$ mol/l) [228]. Damit liegt die zu erwartende Konzentration des Pharmakons im Serum an der möglichen Hemmschwelle für eine Beeinflussung

der BChE-Aktivität. Da die Serumproben jedoch methodisch bedingt 100-fach verdünnt wurden, ist eine Inhibition der BChE-Aktivität unter den gegebenen Testbedingungen nicht wahrscheinlich. Die zu erwartenden Liquorkonzentration des Medikamentes dürften ohnehin weit niedriger als die des Serums sein.

Die Untersuchungsergebnisse zu *Bupivacainwirkungen* wurden bereits im Abschnitt 4.5 erwähnt und im Kapitel 7 sowie im Anhang 2 ausführlich dargestellt [135]. Bupivacain wurde bei Patienten und Kontrollen der im Kapitel 6 dargestellten Untersuchungen zu degenerativen Veränderungen der Lendenwirbelsäule nicht eingesetzt.

Im Ergebnis der vorliegenden Studie konnte bestätigt werden, daß die BChE-Aktivität des lumbalen Liquors als Marker für die sekretorische Aktivität nervaler Zellen und für den funktionellen Zustand der Blut-Liquor-Schranke genutzt werden kann.

5.6 Zusammenfassung

Der ermittelte Referenzbereich der BChE-Aktivität im lumbalen Liquor lag zwischen 5,4 und 17,0 nmol/min x ml.

Die Mehrzahl der ventrikulären Liquorproben des neurochirurgischen Patientengutes zeigte BChE-Aktivitäten bis 6 nmol/min x ml. Unter physiologischen Bedingungen ist damit ein ventriculo-lumbaler BChE-Aktivitätsgradient von ca. 1 : 2 zu erwarten.

Die BChE-Aktivität im normalen lumbalen Liquor rekrutierte sich in erster Linie aus der Enzymsekretion durch Zellen zentralnervaler Herkunft, der Enzymeinstrom über die Blut-Liquor-Schranke spielt eine untergeordnete Rolle.

In den untersuchten ventrikulären Liquorproben überwog die Ultrafiltration des Enzyms durch die Blut-Liquor-Schranke gegenüber der zellulären Sekretion aus dem Nervensystem.

Die BChE-Aktivität des Liquors kann als Marker für die sekretorische Aktivität nervaler Zellen und für den funktionellen Zustand der Blut-Liquor-Schranke genutzt werden.

6. Cholinesteraseaktivitäten und Blut-Liquor-Schrankenfunktion im lumbalen Liquor bei degenerativen Veränderungen der Lendenwirbelsäule [138]

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Analyse funktionrelevanter Liquorparameter bei mit degenerativen Veränderungen der Lendenwirbelsäule einhergehenden Krankheitsbildern.

Die sekretorische Aktivität nervaler Zellen und die Funktion der Blut-Liquor-Schranke sollte untersucht werden.

Zusammenhänge zwischen Veränderungen der Liquorparameter und neurologischen sowie radiologischen Befunden bzw. der Erkrankungsdauer waren zu analysieren.

6.1 Patienten, Parameter, Material und Methoden

6.1.1 Untersuchte Personen

Kontrollgruppe

Eine ausführliche Beschreibung der klinischen und laboranalytischen Auswahlkriterien für in dieser Studie eingesetzte Kontrollpersonen ist dem Abschnitt 3.2.1 zu entnehmen.

Patientengruppe

Da Alterungsprozesse der Wirbelsäule eine physiologische Gegebenheit darstellen, mußte die Auswahl der Patienten nach einer manifesten klinischen Symptomatik vorgenommen werden. Die Charakteristika der Patientengruppe wurden im Abschnitt 3.2.2 vorgestellt.

6.1.2 Parameter und Tests

Zu Entnahmebedingungen der Liquor- und Serumproben siehe Abschnitt 3.1.5.

Untersuchte Parameter:

- Acetylcholinesteraseaktivität im lumbalen Liquor (AChE_{LU})
- Butyrylcholinesteraseaktivität im lumbalen Liquor (BChE_{LU})
- Butyrylcholinesteraseaktivität im Serum (BChE_{SE})
- Gesamteiweißkonzentration des lumbalen Liquors (GEW_{LU})
- Albuminquotient lumbaler Liquor/Serum (QALB_{LU})
- Leukozytenzahlen im lumbalen Liquor (LZ_{LU})
- Weitere Parameter siehe 3.1.3

Charakteristika der Parameter und Analyseverfahren siehe Abschnitt 3.1;
statistische Analysen siehe Abschnitt 3.4.

6.2 Ergebnisse

6.2.1 Vergleich der Kontrollgruppe mit der gesamten Patientengruppe

Einzelne Parameter und Korrelationen

Folgende Parameter waren normal verteilt ($p > 0,05$): Kontrollgruppe: GEW_{LU}, QALB_{LU}, AChE_{LU}, BChE_{LU}, BChE_{SE} und Alter; Patientengruppe: BChE_{SE} und Alter. Keine Normalverteilung ($p < 0,05$) wurde in der Patientengruppe für GEW_{LU}, QALB_{LU}, AChE_{LU}, und BChE_{LU} gefunden. Der Parameter Leukozytenzahl (LZ_{LU}) war sowohl in der Kontroll- als auch in der Patientengruppe nicht normal verteilt. In der Kontrollgruppe ließen sich keine signifikanten ($p > 0,05$) geschlechtsspezifischen Unterschiede bezüglich aller untersuchten Parameter bzw. des Alters nachweisen. Deshalb wurde in der weiteren Analyse keine geschlechtsspezifische Trennung der untersuchten Meßgrößen vorgenommen.

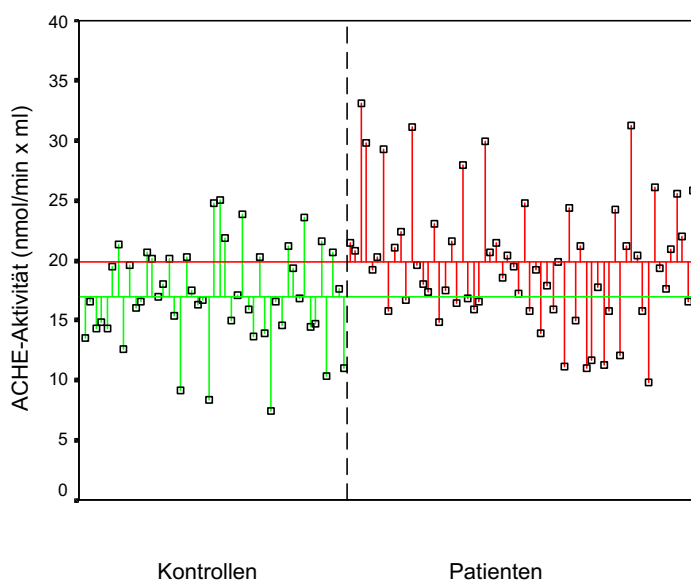
Das mittlere *Alter* (\pm SEM) der Kontrollpersonen (44 ± 2 Jahre; 27 - 79 Jahre) unterschied sich *nicht* signifikant ($p = 0,380$) von dem der Patienten (45 ± 2 Jahre;

27 - 77 Jahre). Für Kontrollpersonen war bereits in den im Kapitel 4 dargestellten Untersuchungen eine Korrelation des Alters zum Parameter $AChE_{LU}$ ausgeschlossen worden. Die bei der Referenzwertbestimmung (Kapitel 5) festgestellte negative Alterskorrelation zu $BChE_{LU}$ konnte in der Kontrollgruppe bestätigt werden (Spearman-Korrelationskoeffizient = -0,36; $p = 0,013$). In der Patientengruppe wurden keine signifikanten Korrelationen des Alters zu den untersuchten Parametern gefunden.

Acetylcholinesteraseaktivität

Die mittlere $AChE_{LU}$ (\pm SEM) war bei Patienten ($19,8 \pm 0,7$ nmol/min x ml; 9,8 - 33,2 nmol/min x ml) signifikant ($p = 0,007$) gegenüber den Kontrollwerten ($17,0 \pm 0,6$ nmol/min x ml; 7,4 - 25,0 nmol/min x ml) *erhöht*. Einzelwerte im Bezug zur mittleren Aktivität sind in Abb. 13 dargestellt. Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen $AChE_{LU}$ und $BChE_{LU}$ in der Kontrollpopulation (Spearman-Korrelationskoeffizient = 0,75; $p < 0,001$) sowie in der gesamten Patientengruppe (Spearman-Korrelationskoeffizient = 0,31; $p = 0,013$).

Abb. 13. Streudiagramm: AChE-Aktivität im Liquor von Kontrollen (grün) und allen Patienten (rot); Mittelwertlinie und Abweichungen der Einzelfälle.



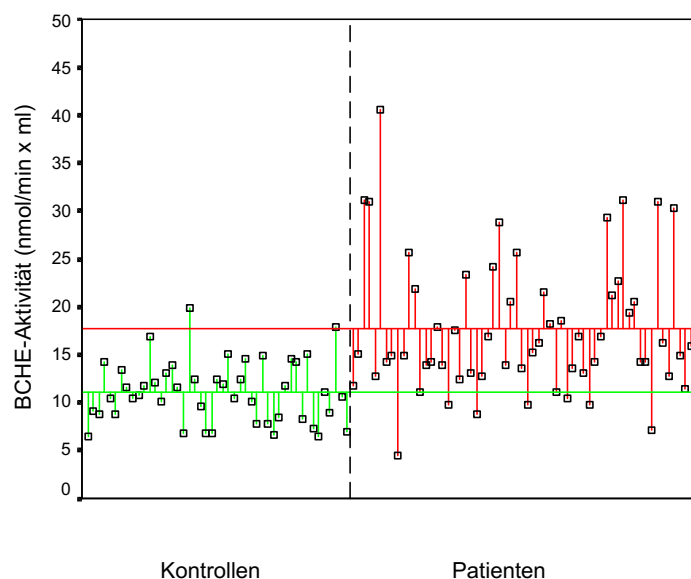
Butyrylcholinesteraseaktivität des Serums

Die mittlere $BChE_{SE}$ (\pm SEM) unterschied sich *nicht* signifikant ($p = 0,365$) im Vergleich zwischen Patienten (8148 ± 263 nmol/min x ml; 3088 - 12415 nmol/min x ml) und Kontrollen (7944 ± 279 nmol/min x ml; 4934 - 12825 nmol/min x ml). $BChE_{SE}$ korrelierte mit $BChE_{LU}$ (Spearman-Korrelationskoeffizient = 0,42; $p = 0,003$) bzw. GEW_{LU} (Spearman-Korrelationskoeffizient = 0,30; $p = 0,041$) bei Kontrollpersonen. In der Patientengruppe wurden keine signifikanten Korrelationen der $BChE_{SE}$ zu anderen Parametern gefunden.

Butyrylcholinesteraseaktivität des Liquors

Die mittleren $BChE_{LU}$ (\pm SEM) war in der Patientengruppe ($17,7 \pm 0,9$ nmol/min x ml; 4,6 - 40,6 nmol/min x ml) signifikant ($p < 0,001$) gegenüber der Kontrollgruppe ($11,1 \pm 0,5$ nmol/min x ml; 6,5 - 19,9 nmol/min x ml) *erhöht* (Abb. 14). Signifikante Korrelationen bestanden in der Kontrollgruppe zum Alter, zu $AChE_{LU}$ und zu $BChE_{SE}$ (siehe oben). Bei Patienten zeigte sich eine signifikante Korrelation zu GEW_{LU} (Spearman-Korrelationskoeffizient = 0,76; $p < 0,001$), $QALB_{LU}$ (Spearman-Korrelationskoeffizient = 0,76; $p < 0,001$) und $AChE_{LU}$ (siehe dort).

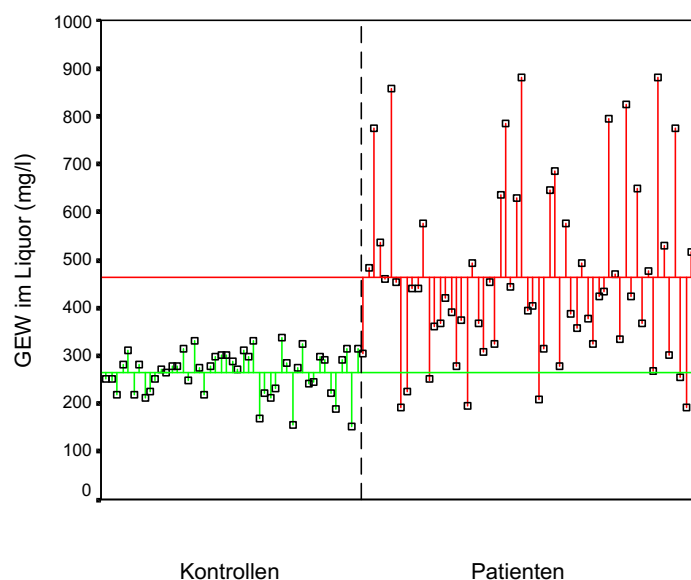
Abb. 14. Streudiagramm: BChE-Aktivität im Liquor von Kontrollen (grün) und allen Patienten (rot); Mittelwertlinie und Abweichungen der Einzelfälle.



Gesamteiweißwerte im Liquor

Die Patienten zeigten signifikant ($p < 0,001$) *höhere* mittlere (\pm SEM) GEW_{LU} (463 ± 23 mg/l; 192 - 882 mg/l) im Vergleich zu Kontrollpersonen (264 ± 7 mg/l; 153 - 339 mg/l). Einzelwerte im Bezug zur mittleren Konzentration sind in Abb. 15 dargestellt. Eine signifikante Korrelation bestand zwischen den Parametern GEW_{LU} und $QALB_{LU}$ (Spearman-Korrelationskoeffizient = 0,81; $p < 0,001$) bzw. $BChE_{SE}$ (siehe dort) in der Kontrollgruppe. In der Patientengruppe korrelierte GEW_{LU} mit $QALB_{LU}$ (Spearman-Korrelationskoeffizient = 0,94; $p < 0,001$) bzw. mit $BChE_{LU}$ (siehe dort).

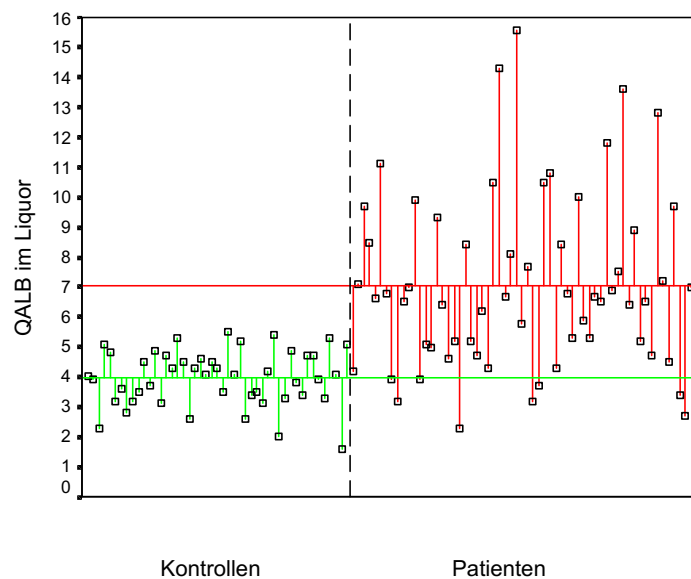
Abb. 15. Streudiagramm: GEW_{LU} von Kontrollen (grün) und allen Patienten (rot); Mittelwertlinie und Abweichungen der Einzelfälle.



Albuminquotient Liquor/Serum

Der mittlere (\pm SEM) $QALB_{LU}$ der Patienten ($7,1 \pm 0,4$; 2,3 - 15,6) war signifikant ($p < 0,001$) *größer* als bei Kontrollpersonen ($4,0 \pm 0,1$; 1,6 - 5,5). Einzelwerte im Bezug zur mittleren Aktivität siehe Abb. 16. Bei Untersuchung der gesamten Patientenpopulation fand sich eine signifikante Korrelation zwischen $QALB_{LU}$ und $BChE_{LU}$ (siehe dort). Korrelationen zu GEW_{LU} in Kontroll- und Patientengruppe - siehe dort.

Abb. 16. Streudiagramm: QALB_{LU} von Kontrollen (grün) und allen Patienten (rot); Mittelwertlinie und Abweichungen der Einzelfälle.



Die mittleren *Leukozytenzahlen* (\pm SEM) im Liquor der Patienten ($1,6 \pm 0,3$) unterschieden sich *nicht* signifikant ($p = 0,369$) von denen der Kontrollgruppe ($1,2 \pm 0,01$). Sowohl in der Kontroll- als auch der Patientengruppe konnte eine intrathekale Immunglobulinsynthese ausgeschlossen werden.

Multiple Regressionsanalyse

Die Regressionsgleichungen (lineare Regression, schrittweise Methode) zur Vorhersage der Werte für AChE_{LU}, BChE_{LU}, GEW_{LU} und QALB_{LU} lauten (ANOVA; R^2):

Kontrollgruppe

- $\text{AChE}_{\text{LU}} = 7,237 + 0,881 \times \text{BChE}_{\text{LU}}$
($F = 41$; $p < 0,001$; $R^2 = 0,47$)
- $\text{BChE}_{\text{LU}} = 1,705 + 0,438 \times \text{AChE}_{\text{LU}} + 0,00054 \times \text{BChE}_{\text{SE}} - 0,053 \times \text{Alter}$
($F = 21$; $p < 0,001$; $R^2 = 0,60$)
- $\text{GEW}_{\text{LU}} = 60,876 + 40,480 \times \text{QALB}_{\text{LU}} + 0,005 \times \text{BChE}_{\text{SE}}$
($F = 66$; $p < 0,001$; $R^2 = 0,75$)
- $\text{QALB}_{\text{LU}} = -0,097 + 0,018 \times \text{GEW}_{\text{LU}} + 0,00008 \times \text{BChE}_{\text{SE}}$
($F = 59$; $p < 0,001$; $R^2 = 0,73$)

Patientengruppe

- $AChE_{LU} = 15,76 + 0,23 \times BChE_{LU}$
($F = 6$; $p = 0,014$; $R^2 = 0,10$)
- $BChE_{LU} = -0,97 + 0,031 \times GEW_{LU} + 0,217 \times AChE_{LU}$
($F = 73$; $p < 0,001$; $R^2 = 0,71$)
- $GEW_{LU} = 13,88 + 45,692 \times QALB_{LU} + 7,15 \times BChE_{LU}$
($F = 283$; $p < 0,001$; $R^2 = 0,91$)
- $QALB_{LU} = 0,22 + 0,015 \times GEW_{LU}$
($F = 415$; $p < 0,001$; $R^2 = 0,87$)

Binäre Regressionsanalyse

Tab. 12. Binäre logistische Regressionsanalyse: Sensitivität (Anteil der richtig Positiven an der Gesamtanzahl der Kranken), Spezifität (Anteil der richtig Negativen an der Gesamtanzahl der Gesunden), niedrigstes Meßergebnis eines als krank berechneten Falles und die Fläche unter der ROC-Kurve (SE; p) der einzelnen Testergebnisse für die Parameter $AChE_{LU}$, $BChE_{LU}$, GEW_{LU} und $QALB_{LU}$.

Parameter	Sensitivität in %	Spezifität in %	Niedrigste Meßergebnis eines als krank berechneten Falles	Fläche unter der ROC-Kurve (SE; p)
$AChE_{LU}$	76	40	16,3 nmol/min/ml	0,65 (0,052; $p = 0,007$)
$BChE_{LU}$	81	72	12,7 nmol/min/ml	0,81 (0,041; $p < 0,001$)
GEW_{LU}	79	85	313 mg/l	0,87 (0,036; $p < 0,001$)
$QALB_{LU}$	76	79	4,8	0,86 (0,036; $p < 0,001$)

Im Ergebnis der Berechnungen unter Einschluß *aller* einzelnen in Tab. 12 genannten Liquorparameter ergab die logistische Regressionsanalyse eine Sensitivität von 77% und eine Spezifität von 83%.

6.2.2 Vergleich der Patienten-Untergruppen mit der Kontrollgruppe und untereinander

Die Ergebnisse der Laboranalyse in den nach neurologischem Status, Lokalisation des Engpasses und Erkrankungsdauer definierten Patienten-Untergruppen sind detailliert in Tab. 13 dargestellt. Die Daten der Kontrollwerte wurden ausführlich im Abschnitt 6.2.1 beschrieben.

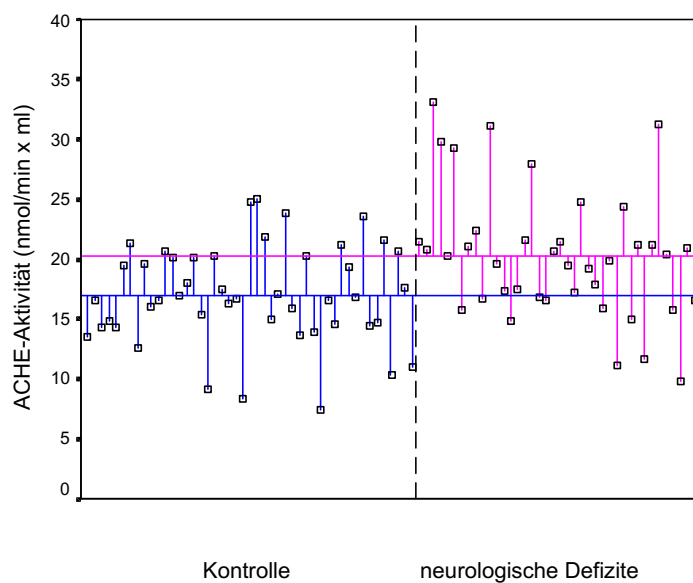
Tab. 13. Laboranalytische Daten der Patienten-Untergruppen definiert nach neurologischen Ausfallserscheinungen, Lokalisation der Engpasses im MRT und der Erkrankungsdauer zum Punktionszeitpunkt. Patientenzahl (n).

		<i>n</i>	<i>AChE_{LU}</i> (nmol/min x ml)	<i>BChE_{LU}</i> (nmol/min x ml)	<i>GEW_{LU}</i> (mg/l)	<i>QALB_{LU}</i>
Neurologisches Defizit	mit	40	20,2 ± 0,9 (9,8 - 33,1)	17,4 ± 1,2 (4,5 - 40,6)	468 ± 28 (192 - 882)	7,2 ± 0,4 (3,2 - 15,6)
	ohne	22	19,1 ± 1,1 (11,0 - 29,9)	18,1 ± 1,4 (8,8 - 31,2)	454 ± 44 (192 - 880)	6,9 ± 0,7 (2,3 - 13,6)
Engpaß im MRT	medial	29	18,5 ± 1,0 (9,8 - 31,2)	15,9 ± 1,0 (7,1 - 31,2)	441 ± 30 (192 - 882)	6,9 ± 0,5 (2,7 - 15,6)
	lateral	33	21,0 ± 0,9 (11,3 - 33,1)	19,2 ± 1,4 (4,5 - 40,6)	483 ± 35 (192 - 880)	7,2 ± 0,5 (2,3 - 14,3)
Erkrankungs- dauer	akut	19	19,9 ± 1,1 (11,3 - 33,1)	17,7 ± 1,7 (8,8 - 31,2)	448 ± 44 (192 - 795)	6,5 ± 0,7 (3,7 - 14,3)
	chronisch	43	19,8 ± 0,8 (9,8 - 31,3)	17,6 ± 1,1 (4,5 - 40,6)	470 ± 28 (192 - 882)	7,3 ± 0,4 (2,3 - 15,6)
Kontrollgruppe		47	17,0 ± 0,6 (7,4 - 25,0)	11,1 ± 0,5 (6,5 - 19,9)	264 ± 7 (153 - 339)	4,0 ± 0,1 (1,6 - 5,5)

Neurologische Defizite

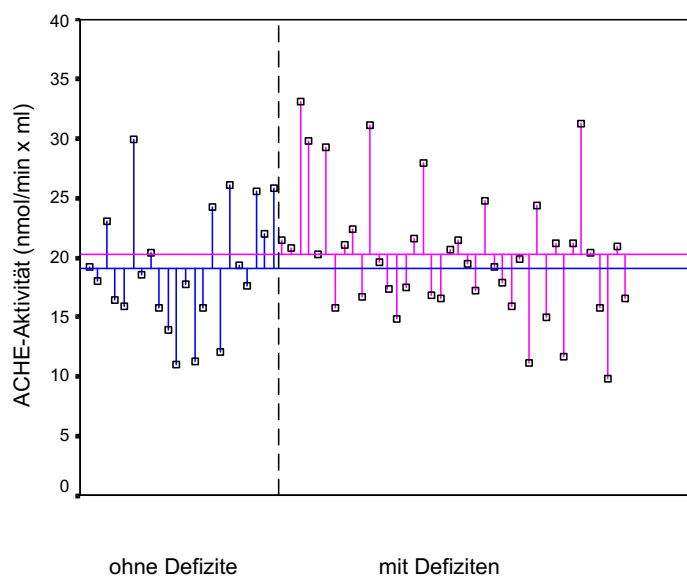
AChE_{LU} war bei Patienten *mit* neurologischen Ausfallserscheinungen *signifikant* ($p = 0,005$) gegenüber den Kontrollen *erhöht* (Abb. 17). Patienten *ohne* neurologische Defizite zeigten *keine* signifikante Erhöhung der mittleren *AChE_{LU}* im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0,155$).

Abb. 17. Streudiagramm. AChE_{LU} der Kontrollgruppe (blau) und der Patienten mit neurologischen Ausfallserscheinungen (rot). Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert.



Es bestanden keine signifikanten Unterschiede der mittleren AChE_{LU} bezüglich neurologischer Defizite innerhalb der Patientenpopulation (Abb. 18).

Abb. 18. Streudiagramm. AChE_{LU} bei Patienten ohne (blau) und mit (rot) neurologischen Ausfallserscheinungen. Abweichung der Einzelmessungen vom Mittelwert.

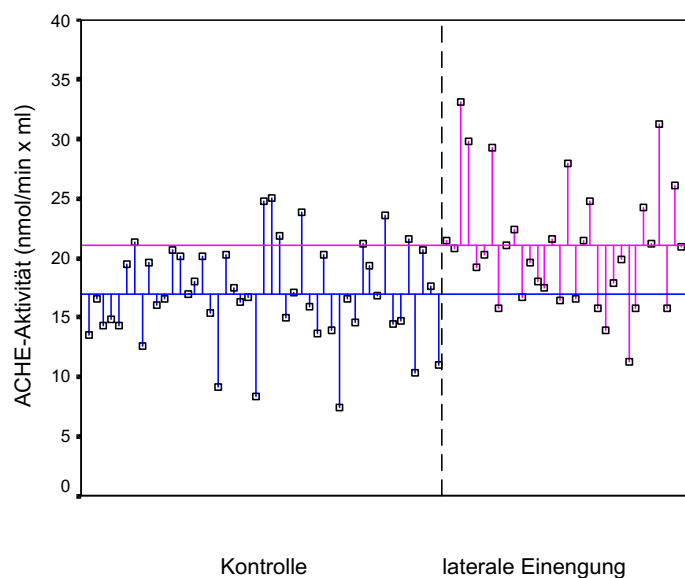


Alle anderen Liquorparameter waren unabhängig vom neurologischen Befund in beiden Patienten-Untergruppen *signifikant* gegenüber der Kontrollgruppe *erhöht* ($p < 0,05$). Das Vorliegen *neurologischer Defizite* verursachte *keine zusätzliche* signifikante Erhöhung der untersuchten Liquorwerte ($p > 0,05$ für BChE_{LU}, GEW_{LU} und QALB_{LU} im direkten Vergleich der Patientengruppe *mit* neurologischen Defiziten zur Patientengruppe *ohne* neurologische Ausfallserscheinungen).

Lokalisation der magnetresonanztomographisch nachgewiesenen Engpässe

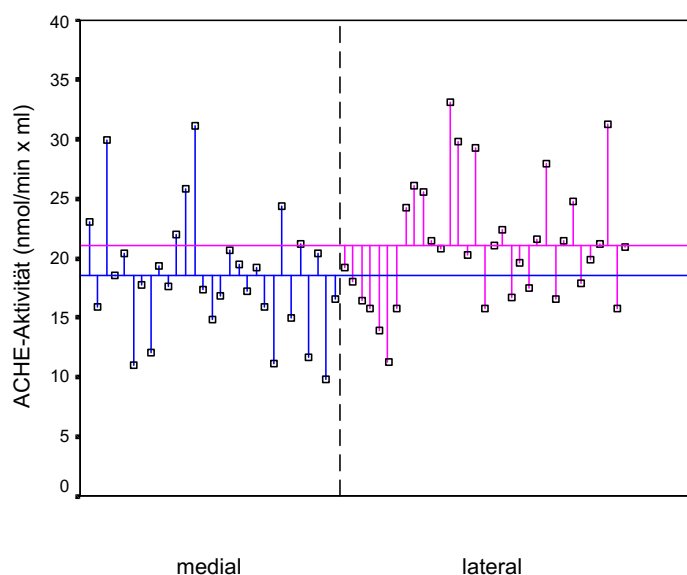
AChE_{LU} war bei Patienten mit *lateralen* Engpässen signifikant ($p = 0,001$) gegenüber den Kontrollen *erhöht* (Abb. 19). Patienten mit medial lokalisierten Einengungen zeigten keine signifikante Erhöhung der AChE_{LU} im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0,248$).

Abb. 19. Streudiagramm. AChE_{LU} der Kontrollgruppe (blau) und der Patienten mit lateralen Engpässen (rot). Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert.



Der direkte Vergleich zwischen Patienten mit lateralen und medialen Einengungen zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied der AChE_{LU} (Abb. 20).

Abb. 20. Streudiagramm. AChE_{LU} bei Patienten mit medialen (blau) und lateralen (rot) Engpässen. Abweichung der Einzelmessungen vom Mittelwert.



BChE_{LU}, GEW_{LU} und QALB_{LU} waren *unabhängig* von der Lokalisation der spinalen Einengung *signifikant* gegenüber der Kontrollgruppe *erhöht* ($p < 0,05$). Bei keinem dieser Parameter bestand ein signifikanter Unterschied zwischen medial und lateral betonten Engpässen ($p > 0,05$ im direkten Vergleich zwischen den Patienten-Untergruppen).

Erkrankungsdauer zum Punktionszeitpunkt

Alle Liquorparameter waren *unabhängig* von der Dauer der Symptomatik in beiden Untergruppen *signifikant* gegenüber der Kontrollgruppe *erhöht* ($p < 0,05$). Das Zeitintervall zwischen Einsetzen der Symptome und der Lumbalpunktion beeinflusste die untersuchten Liquorgrößen *nicht* *signifikant* ($p > 0,05$ für alle Parameter im direkten Vergleich zwischen den Gruppen mit akuter und chronischer Symptomatik).

Korrelationen zwischen Erkrankungsdauer, Lokalisation der Engpässe und neurologischen Ausfallserscheinungen

84% der Patienten mit akuter Symptomatik zeigten neurologische Defizite, während 56% der chronisch erkrankten Patienten Ausfallserscheinungen aufwiesen. Es bestand eine geringe (Spearman-Korrelationskoeffizient = 0,27)

signifikante ($p = 0,03$) Korrelation zwischen akuter Symptomatik und neurologischem Defizit.

Es wurde keine signifikante Korrelation zwischen Lokalisation der Engpässe und neurologischen Ausfallerscheinungen gefunden.

74% der akut symptomatischen Patienten hatten laterale Engpässe, während 44% der chronisch Erkrankten laterale Einengungen zeigten. Eine geringe (Spearman-Korrelationskoeffizient = 0,27) signifikante ($p = 0,03$) Korrelation zwischen lateralen Engpässen und akuter Symptomatik wurde nachgewiesen.

6.3 Diskussion der Ergebnisse

Entsprechend der Zielstellung dieser Studie wurden funktionsrelevante Liquorparameter untersucht, um zu analysieren, ob durch Degeneration der Lendenwirbelsäule verursachte Alterationen der Meningen und/oder neuraler Strukturen signifikante biochemische Veränderungen induzieren. Da Alterung der Wirbelsäule eine physiologische Erscheinung darstellt, erfolgte die Patientenauswahl nach manifester klinischer Symptomatik, elektrophysiologischer und bildgebender Diagnostik. Komorbiditäten wurden weitgehend ausgeschlossen.

Im Ergebnis der Untersuchungen wurde eine signifikante Erhöhung der Cholinesteraseaktivitäten im Liquor von Patienten relativ zur Kontrollgruppe gefunden. Von besonderem Interesse war die Veränderung der *AChE*, einem Funktionsmarker sekretorischer Zellaktivität. Die in den vorliegenden Untersuchungen gefundene Aktivitätserhöhung der AChE ist als Indiz für eine reizinduzierte *Steigerung der sekretorischen (funktionellen) Aktivität* von Zellen des Nervensystems zu werten.

Die Aktivierung dieser AChE-sezernierenden Zellen könnte nach den vorliegenden Ergebnissen vom Ausmaß des mechanischen Reizes abhängig sein. *Laterale Einengungen* im Bereich der knöchern umlagerten Nervenwurzel führten zur signifikanten Erhöhung der AChE-Aktivität, während bei mediale Engpässen (im Bereich räumlich größerer Ausweichmöglichkeiten für das Myelon) geringere Erhöhungen der Enzymaktivität nachweisbar waren. Diese Hypothese wird unterstützt durch den Befund, daß die AChE-Aktivität bei Vorliegen *neurologischer Defizite* deutlicher erhöht war als bei Patienten ohne

neurologische Ausfallserscheinungen. Es ist eine bekannte Tatsache, daß das Ausmaß nervaler Defizite druckabhängig ist.

Die *Erkrankungsdauer* vom Einsetzen der Symptome bis zur Liquorpunktion scheint dagegen keinen meßbaren Einfluß auf die sekretorische Aktivität der nervalen Zellen zu haben. Der chronische Reiz stimuliert offensichtlich ebenso wie der akute. Einschränkend muß erwähnt werden, daß bei dem untersuchten Patientengut mindestens ein Zeitraum von einer Woche zwischen Beginn der Symptomatik und Lumbalpunktion lag. Die Untersuchungen können deshalb keine Auskunft über die *initiale* Phase nach dem symptomauslösenden Ereignis geben. Es ist durchaus denkbar, daß die Enzymveränderungen in dieser initialen Phase weit deutlicher ausfallen.

Auch die mittlere BChE-Aktivität war bei Patienten im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöht. Zusammenhänge mit der Lokalisation des Engpasses, neurologischem Status oder der Erkrankungsdauer konnten nicht gefunden werden. Da BChE aus mehreren Quellen in den Liquor eingeschleust werden kann (siehe Kapitel 1 und 5), sind bei der Suche nach möglichen Herkunftsorten des Enzyms unter den vorliegenden pathologischen Bedingungen die Ergebnisse der *Korrelationsanalyse* bedeutsam. Unter normalen Bedingungen (Kontrollgruppe) korrelierte $BChE_{LU}$ vordergründig mit $AChE_{LU}$ (Korrelationskoeffizient 0,75), dem Parameter, der die sekretorische Aktivität Cholinesterase-sezernierender Zellen des Nervensystems reflektiert. Bei Patienten stellt sich zusätzlich eine markante Korrelation der $BChE_{LU}$ zu $QALB_{LU}$ (Parameter, der den Zustand der Blut-Liquor-Schranke beschreibt; Korrelationskoeffizient 0,76) und zu GEW_{LU} (Korrelationskoeffizient 0,76) dar. Der Korrelationskoeffizient mit $AChE_{LU}$ ist in der Patientengruppe mit 0,31 niedriger als in der Kontrollgruppe. *Wie bereits im Kapitel 5 bezüglich der vergleichenden Wertung von BChE-Aktivitäten im lumbalen und ventrikulären Liquor angedeutet, ist folglich anzunehmen, daß im Normalfall die BChE-Aktivität des lumbalen Liquors in erster Linie von der Sekretion des Enzyms aus Zellen des Nervensystems bestimmt wird. Unter pathologischen Bedingungen dagegen resultiert eine gesteigerte BChE-Aktivität offensichtlich aus zusätzlichem Einstrom des Enzyms über die Blut-Liquor-Schranke.*

Diese Hypothese wird durch die bei der Patientengruppe im Vergleich zur altersentsprechenden Kontrollgruppe signifikant erhöhten mittleren

Liquor/Serum-Albuminquotienten untermauert. Bei lumbalen spinalen Kompressionssyndromen kann somit eine *lokale Schädigung der Blut-Liquor-Schrankenfunktion* angenommen werden.

Kobayashi et al. [140] fertigten nach intravenöser Applikation von Gadolinium magnetresonanztomographische Bilder der Wirbelsäule von Patienten mit lumbalen Bandscheibenvorfällen an. Sie fanden die betroffenen Nervenwurzeln stark mit dem Kontrastmittel angereichert und schlußfolgerten, daß eine lokale Schädigung der Blut-Liquor(-Nerv)-Schranke im Bereich der Läsion vorliegen müsse. Skouen et al. [240] berichteten über einen signifikant größeren mittleren Albuminquotienten bei lateralen im Vergleich zu medialen Bandscheibenvorfällen. Sie folgerten, daß Plasmaproteine hauptsächlich im Bereich der Nervenwurzel durch eine gestörte Schranke in das Liquorkompartiment eintreten müssen [239]. Eigene Untersuchungen konnten letztere Beobachtungen bezüglich der bevorzugten lateralen Lokalisation einer möglichen Schrankenstörung nicht bestätigen. $QALB_{LU}$ (Schrankenparameter) war im Vergleich medialer zu lateraler Einengung des Spinalkanals bzw. des Neuroforamens *nicht* signifikant unterschiedlich. Vielmehr deutete sich die oben erwähnte Beziehung des Funktionsparameters nervaler Zellaktivität ($AChE_{LU}$) zur Lokalisation des Engpasses an. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren sowohl die Cholinesteraseaktivitäten als auch Albuminquotient und Gesamteiweiß des Patientenliquors erhöht. Es kann deshalb angenommen werden, daß bereits eine geringe Alteration der Meningen und/oder neuronaler Strukturen im medialen wie auch lateralen Bereich des Spinalkanals genügt, um eine relevante *lokale Schrankenstörung* bzw. *gesteigerte funktionelle Aktivität nervaler Zellen* zu induzieren.

Die erhöhte mittlere Gesamteiweißkonzentration im Liquor kann einerseits im Sinne einer erhöhten Proteinfreisetzung aus Zellen des Nervensystems oder andererseits als Folge gesteigerten Proteineinstroms durch die gestörte Blut-Liquor-Schranke interpretiert werden. Es ist bekannt, daß Druckeinwirkung auf neuronale Gewebe zu einem *endoneuralen Ödem* führt [63,198]. Skouen et al. [237] nahmen an, daß diese endoneurale Ödembildung eine axonale Degeneration begünstigt. Eine Blockierung des schnellen axonalen Proteintransportes und Akkumulation von Proteinen im Axon an der Kompressionsstelle wurde von Rydevik et al. [217] gefunden. Strukturelle Schäden an den Neuronen können an

diesen Lokalisationen die *Ausschleusung von Eiweißen* in den extrazellulären Raum bewirken und damit erhöhte Eiweißkonzentrationen im Liquor erklären.

Das häufig als Ursache für erhöhte Gesamteiweißkonzentrationen im Liquor auch bei Bandscheibenvorfällen genannte Phänomen des “Stopp-Liquor” liefert offensichtlich bei der Mehrzahl degenerativer lumbaler Wirbelsäulenschäden keine hinreichende Erklärung für die diagnostizierte Proteinerhöhung. Der Begriff „Stopp-Liquor“ sollte nur im Zusammenhang mit einer nachgewiesenen Liquorzirkulationsstörung verwendet werden, die einen Albuminquotienten $> 100 \times 10^{-3}$ induziert [83]. Die klinische Erfahrung (Myelographie, MRT, operative Dekompression) zeigt, daß eine relevante Einengung des intraduralen Raumes bei Bandscheibenvorfällen selten vorliegt. Auch in den vorliegenden Studien konnte bei alleinigem Kontakt von Osteophyten bzw. degeneriertem Bandscheibengewebe zur Dura ohne Einengung des intraduralen Raumes (laterale Engpässe der Nervenwurzel) eine signifikante Erhöhung der Gesamteiweißkonzentration nachgewiesen werden.

Olmarker et al. [198] und Skouen et al. [237] beobachteten in Tierversuchen, daß bei schnell einsetzender Kompression die endoneurale Ödembildung an spinalen Nervenwurzeln deutlicher ausfiel als bei langsam zunehmendem Druck. Nach den hier vorliegenden Ergebnissen konnte im direkten Vergleich der mittleren Meßgrößen GEW_{LU} bzw. $QALB_{LU}$ kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit bis zu 4 Wochen dauernder Erkrankung („akut“) und Patienten mit längerer Erkrankungsdauer („chronisch“) festgestellt werden. Einschränkend ist wiederum zu bemerken, daß keine der untersuchten Liquorproben in der initialen Phase nach dem Schädigungsereignis entnommen wurde (siehe oben).

Die neben den Liquoruntersuchungen angestellten Häufigkeitsvergleiche hinsichtlich der Zusammenhänge zwischen Erkrankungsdauer, Lokalisation der Engpässe und neurologischen Ausfallserscheinungen vermitteln einen nebenbefundlichen Überblick. Kikuchi et al. [132] wiesen einen Anpassungsprozeß der Nervenwurzeln an chronische Kompression nach. Bei durch anhaltenden Druck konditionierten Nerven fiel die Nervenleitgeschwindigkeit unter akuter Kompression weniger stark ab als bei Nerven, die bis dahin keinem Druck ausgesetzt waren. Dieser Befund bestätigte

sich indirekt durch die nachgewiesene Korrelation zwischen Erkrankungsdauer und neurologischen Ausfallserscheinungen.

Das Patientenalter korrelierte im vorliegenden Untersuchungsgut nur mit BChE_{LU} in der Kontrollgruppe (geringe negative Korrelation). Weitere Alterskorrelationen analysierter Parametern wurden weder bei Kontrollen noch in der Patientengruppe beobachtet. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu den Erkenntnissen von Nakano et al. [189] und Lange [154] welche erhöhte AChE-Aktivitäten im Liquor mit zunehmendem Alter der untersuchten Personen fanden.

Nach den Ergebnissen der logistischen Regressionsanalyse wären 80% der vorliegenden Fälle (Kontrollpersonen und Patienten) bei Einbeziehung aller getesteten biochemischen Liquorparameter korrekt diagnostiziert worden. Trotz dieses relativ hohen Prozentsatzes ist keiner der getesteten Liquorparameter als spezifisch für mit degenerativen Schäden der Lendenwirbelsäule assoziierte Krankheitsbilder anzusehen. Ebenso wenig können die untersuchten Parameter zur Differentialdiagnose der verschiedenen Ursachen spinaler Engpaßsyndrome genutzt werden. Bereits ein Blick auf die Abb. 13 bis 16 zeigt, daß die interindividuelle Streubreite der untersuchten Liquorparameter relativ groß ist und damit differentialdiagnostische Erwägungen für die klinische Routine nicht in Frage kommen. Die dargestellten Untersuchungen ermöglichten jedoch einen Erkenntniszuwachs hinsichtlich *funktioneller Schädigungen* von neuronalen Strukturen und Meningen. Es muß beachtet werden, daß die analysierten Meßgrößen einen momentanen Zustand von Gewebefunktionen beschreiben, da intraindividuelle Vergleichswerte für die Studie nicht verfügbar waren. Möglicherweise wäre der Erkenntnisgewinn aus intraindividuellen Verläufen bedeutend größer. Dieser Problematik könnte in weiterführenden Untersuchung Rechnung getragen werden.

6.4 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Analyse funktionrelevanter Liquorparameter bei mit degenerativen Veränderungen der Lendenwirbelsäule einhergehenden Krankheitsbildern.

Bei 62 Patienten mit degenerativer Schädigung der lumbalen Wirbelsäule und 47 altersentsprechenden Kontrollpersonen wurden der Blut-Liquor-Schrankenstatus

und sekretorische Funktionsparameter neuronaler und meningealer Zellen im lumbalen Liquor analysiert. Die Patienten wurden nach neurologischem Status, Erkrankungsdauer und MRT-Befund in Untergruppen eingeteilt.

Signifikante Erhöhungen der Liquorparameter Acetylcholinesteraseaktivität, Butyrylcholinesteraseaktivität, Gesamteiweißkonzentration und Liquor/Serum-Albuminquotient wurden im Mittel aller Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen.

Die mittlere Acetylcholinesteraseaktivität war nur bei Patienten mit neurologischen Defiziten signifikant gesteigert. Bei Patienten ohne neurologische Ausfallserscheinungen war die Erhöhung der Acetylcholinesteraseaktivität nicht signifikant. Intraindividuelle Verlaufsuntersuchungen könnten diese Erkenntnisse sicher erweitern.

Magnetresonanztomographisch diagnostizierte laterale Engpässe führten zu einer signifikanten Steigerung der Acetylcholinesteraseaktivität. Mediale Engpässe bedingten ebenfalls eine Erhöhung des Parameters, jedoch war diese nicht signifikant.

Signifikante Erhöhungen der Butyrylcholinesteraseaktivität und der Gesamteiweißkonzentration im Liquor bzw. des Liquor/Serum-Albuminquotienten fanden sich unabhängig vom neurologischen Status bzw. von der Lokalisation des Engpasses.

Hinsichtlich der Erhöhung aller untersuchter Liquorparameter waren keine signifikanten Unterschiede zwischen akuten und chronischen Krankheitsbildern festzustellen.

Die dargestellten Untersuchungen vermitteln Erkenntnisse hinsichtlich funktioneller Schädigung von Meningen und neuronalen Strukturen bei symptomatischen degenerativen Erkrankungen der Lendenwirbelsäule. Die Aktivitätserhöhung der Acetylcholinesterase ist Indiz für eine reizinduzierte Steigerung der sekretorischen (funktionellen) Aktivität von Zellen des Nervensystems. Die Aktivierung der Acetylcholinesterase-sezernierenden Zellen könnte vom Ausmaß des mechanischen Reizes abhängig sein. Die Butyrylcholinesteraseaktivität ist unter Schädigungsbedingungen hauptsächlich durch gesteigerten Enzymestrom aus dem Blut erhöht. Eine lokale

Permeabilitätserhöhung der Blut-Liquor-Schranke kann unter den vorliegenden pathologischen Bedingungen angenommen werden.

7. Einfluß von Bupivacain auf Cholinesteraseaktivitäten, Gesamtprotein und Albuminquotient [139]

Die Anwendung von Bupivacain in der Spinal- und Lokalanästhesie wird allgemein als sicher angesehen, da die therapeutische Breite des Medikamentes relativ groß ist. Man weiß jedoch wenig über mögliche zytotoxische Effekte bei Nutzung therapeutischer Dosierungen am Menschen. Ebenso wenig weiß man über Wirkungen des Lokalanästhetikums hinsichtlich funktioneller (sekretorischer) Aktivität nervaler Zellen. Ein eventuell vorliegender Effekt intrathekaler oder paraspinaler Bupivacaininjektionen auf die Funktion der Blut-Liquor-Schranke wurde am Menschen bisher nicht untersucht. Histologische Untersuchungen von menschlichen Geweben, die unter direktem Einfluß von Bupivacain standen, sind aus ethischen Gründen kaum möglich. In der vorliegenden Studie wurden deshalb Serum- und Liquorproben von orthopädischen Patienten analysiert, wobei die Gewinnung des Untersuchungsmaterials innerhalb der klinischen Diagnostik und Therapie keine zusätzliche Belastung für den Patienten bedeutete.

Das Ziel dieser Untersuchungen war die Analyse von Liquor- und Serumveränderungen der Cholinesteraseaktivitäten, des Gesamtproteins und der Albuminkonzentration bei Patienten, die Bupivacain als Spinalanästhetikum oder als Infiltrationsanästhetikum im Bereich der Lendenwirbelsäule erhalten hatten.

Weiterhin sollte die Aktivität der BChE bzw. die Konzentration des Albumins im Serum als Parameter der Leberfunktion analysiert werden [34,123].

Als Vergleichsgruppe für die Analyse der Serumparameter wurden Patienten untersucht, die sich einem operativen Eingriff unter Allgemeinnarkose unterzogen hatten.

7.1 Parameter, Material, Methoden und Patienten

7.1.1 Parameter und Tests

Charakteristika der Parameter und Analyseverfahren einschließlich des eingesetzten Medikamentes siehe Abschnitt 3.1; statistische Analysen siehe Abschnitt 3.4. Zu Entnahmebedingungen der Liquor- und Serumproben siehe Abschnitt 3.1.5.

Untersuchte Parameter:

- Acetylcholinesteraseaktivität im lumbalen Liquor (AChE_{LU})
- Butyrylcholinesteraseaktivität im lumbalen Liquor (BChE_{LU})
- Butyrylcholinesteraseaktivität im Serum (BChE_{SE})
- Butyrylcholinesterasequotient Liquor/Serum (QBChE_{LU})
- Gesamteiweißkonzentration des lumbalen Liquors (GEW_{LU})
- Albuminkonzentration im Liquor (ALB_{LU})
- Albuminkonzentration im Serum (ALB_{SE})
- Albuminquotient lumbaler Liquor/Serum (QALB_{LU})
- Weitere Parameter siehe 3.1.3.

Liquor- und Serumproben wurden vor der Applikation von Bupivacain bzw. vor Einleitung der Allgemeinnarkose entnommen (baseline = *BL*). Weitere Probeentnahmen erfolgten nach 24 Stunden (*24h*) und nach 48 Stunden (*48h*).

Eine nach Geschlechtern getrennte Analyse der Parameter wurde aufgrund der in den vorangegangenen Kapiteln dargestellten Erkenntnisse nicht vorgenommen.

In den Patientengruppen ohne therapeutisch indizierte Lumbalpunktion wurde aus ethischen Erwägungen auf eine Liquorentnahme (-untersuchung) verzichtet.

7.1.2 Patientengruppen

Da diese Studie auf Verlaufsuntersuchungen basiert, erübrigt sich der Einsatz einer Kontrollgruppe. Eine solche wäre im Sinne der Applikation von Placebo ethisch nicht vertretbar. An der Studie nahmen nur Personen mit primär normalen Laborparametern (Ausgangswerte der Blut- und Liquoranalyse) teil.

Spinalanästhesie mit Bupivacain für operative Versorgung

17 Patienten (11 weiblich und 6 männlich, mittleres Alter \pm SEM: 69 ± 2 Jahre; 51 - 80 Jahre) erhielten eine Knieendoprothese unter Spinalanästhesie mit Bupivacain. Ein intrathekaler Katheter wurde für 48 Stunden nach dem Eingriff belassen. Einer initialen Dosis von 10,0 - 17,5 mg Bupivacain folgten kontinuierliche oder in einzelnen Dosen verabreichte Bupivacaingaben von insgesamt 21,0 - 115,0 mg über 48 Stunden zur Schmerzbehandlung.

Parameter: GEW_{LU} , ALB_{LU} , ALB_{SE} , $QALB_{LU}$, $AChE_{LU}$, $BChE_{SE}$, $BChE_{LU}$, $QBChE_{LU}$. Proben entnommen: vor initialer Bupivacaingabe (*BL*), 24 Stunden (*24h*) und 48 Stunden (*48h*) nach der initialen Bupivacaingabe. Eine weitere therapeutische Bupivacainapplikation im Anschluß an die letzte Probeentnahme hatte keinen Einfluß auf die Studienergebnisse.

Intrathekale Bupivacainanästhesie ohne operativen Eingriff

8 Patienten mit degenerativen Erkrankungen der lumbosakralen Bandscheiben bzw. Wirbelgelenke (1 weiblich und 7 männlich, mittleres Alter \pm SEM: 44 ± 4 Jahre; 30 - 66 Jahre) erhielten eine einmalige intrathekale Applikation von 5,0 - 15,0 mg Bupivacain zur Schmerzbehandlung.

Parameter: GEW_{LU} , ALB_{SE} , ALB_{LU} , $QALB_{LU}$, $AChE_{LU}$, $BChE_{SE}$, $BChE_{LU}$, $QBChE_{LU}$. Proben entnommen: vor initialer Bupivacainapplikation (*BL*) und 24 Stunden nach der initialen Bupivacaingabe. Aus therapeutischen Erwägungen wurde im Anschluß an die Verlaufskontrolle (*24h*) eine weitere intrathekale Bupivacaindosis zur Schmerzbehandlung appliziert. Letztere hatte keinen Einfluß auf die Studienergebnisse.

Infiltrationsanästhesie arthrotisch veränderter Wirbelgelenke mit Bupivacain

16 Patienten mit degenerativer Erkrankung der lumbosakralen Wirbelgelenke (4 weiblich und 12 männlich, mittleres Alter \pm SEM: 46 ± 3 Jahre; 30 - 69 Jahre) erhielten eine periartikuläre Injektion mit 5,0 - 15,0 mg Bupivacain zur Schmerzbehandlung.

Parameter: ALB_{SE}, BChE_{SE}. Serumproben entnommen: vor initialer Bupivacaingabe (*BL*), 24 Stunden (*24h*) und 48 Stunden (*48h*) nach der initialen Bupivacainapplikation.

Operative Versorgung unter Allgemeinnarkose ohne Bupivacaingabe

10 Patienten (6 weiblich und 4 männlich, mittleres Alter \pm SEM: 63 ± 3 Jahre; 47 - 79 Jahre) erhielten eine Knieendoprothese unter Allgemeinnarkose ohne Bupivacaingabe.

Parameter: ALB_{SE}, BChE_{SE}. Serumproben entnommen: vor Einleitung der Allgemeinnarkose (*BL*), 24 Stunden (*24h*) und 48 Stunden (*48h*) nach Einleitung der Allgemeinanästhesie.

7.2 Ergebnisse

In keiner der untersuchten Patientengruppen fanden sich geschlechtsspezifische Parameterunterschiede ($p > 0,05$). Korrelationstests konnten in keiner Untersuchungsgruppe einen Zusammenhang zwischen Patientenalter und untersuchten Parametern nachweisen ($p > 0,05$). In allen untersuchten Liquores dieser Studie wurden die Leukozytenzahlen bestimmt. Weder in den Ausgangs- noch in den Verlaufskontrollen zeigten sich diesbezüglich relevante Abweichungen vom Referenzbereich. Intrathekale Immunglobulinsynthesen wurden in keinem Fall gefunden.

Die Abb. 21 bis 23 veranschaulichen die wichtigsten Ergebnisse im Diagramm.

Abb. 21. Mittlere Cholinesteraseaktivitäten im Liquor (nmol/min x ml) \pm SEM. Patientengruppen: Chirurgischer Eingriff unter Spinalanästhesie, Spinalanästhesie ohne chirurgischen Eingriff. Probeentnahmen: vor Applikation von Bupivacain (baseline = *BL*), nach 24 Stunden (*24h*) und nach 48 Stunden (*48h*). Bei Spinalanästhesie ohne chirurgischen Eingriff wurde nur eine Verlaufskontrolle nach 24 Stunden durchgeführt.

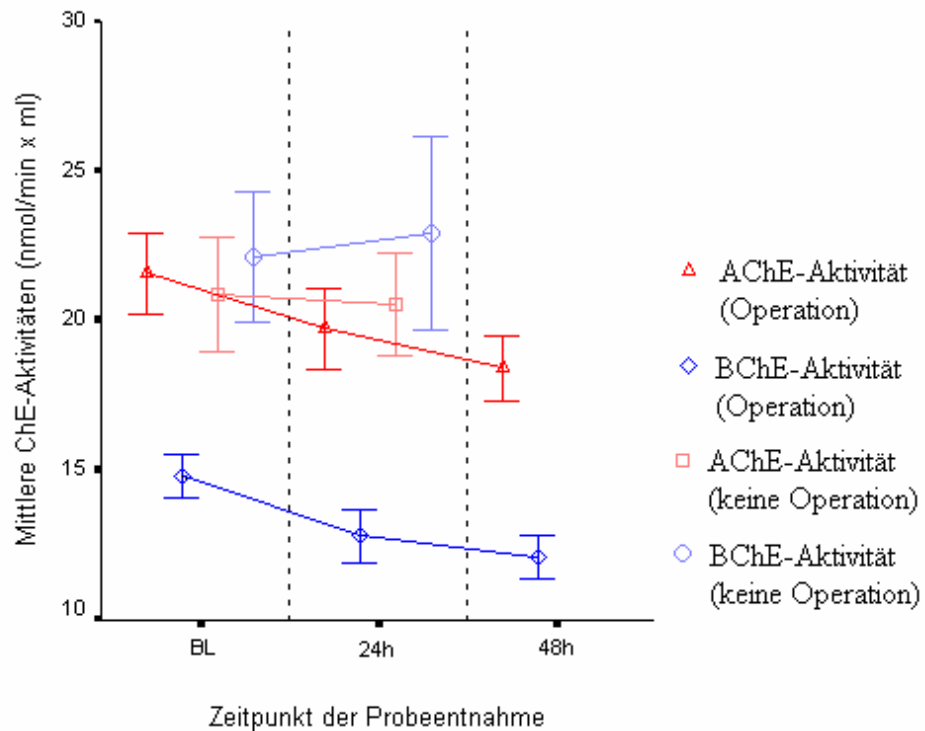


Abb. 22. Mittlere BChE-Aktivität im Serum ($\text{nmol/min} \times \text{ml}$) \pm SEM. Patientengruppen: Chirurgischer Eingriff unter Spinalanästhesie, Spinalanästhesie ohne chirurgischen Eingriff, Fassetgelenkinfiltration mit Bupivacain, Chirurgischer Eingriff unter Allgemeinanästhesie. Probeentnahmen: vor Applikation von Bupivacain bzw. vor Einleitung der Allgemeinnarkose (baseline = *BL*), nach 24 Stunden (*24h*) und nach 48 Stunden (*48h*). Bei Spinalanästhesie ohne chirurgischen Eingriff wurde nur eine Verlaufskontrolle nach 24 Stunden durchgeführt.

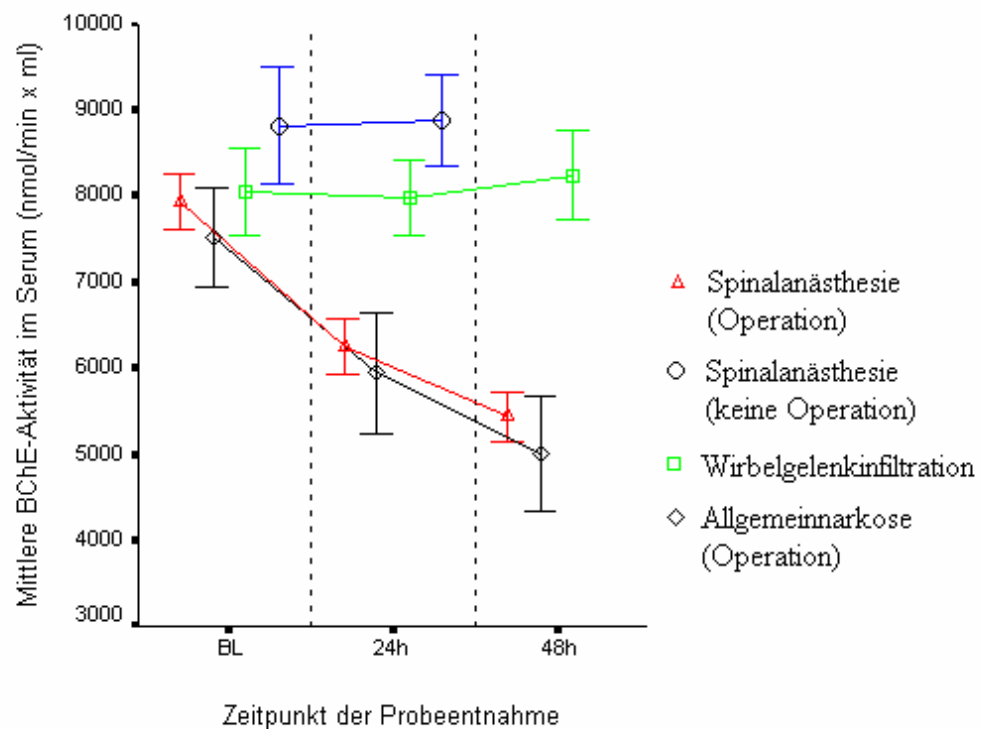
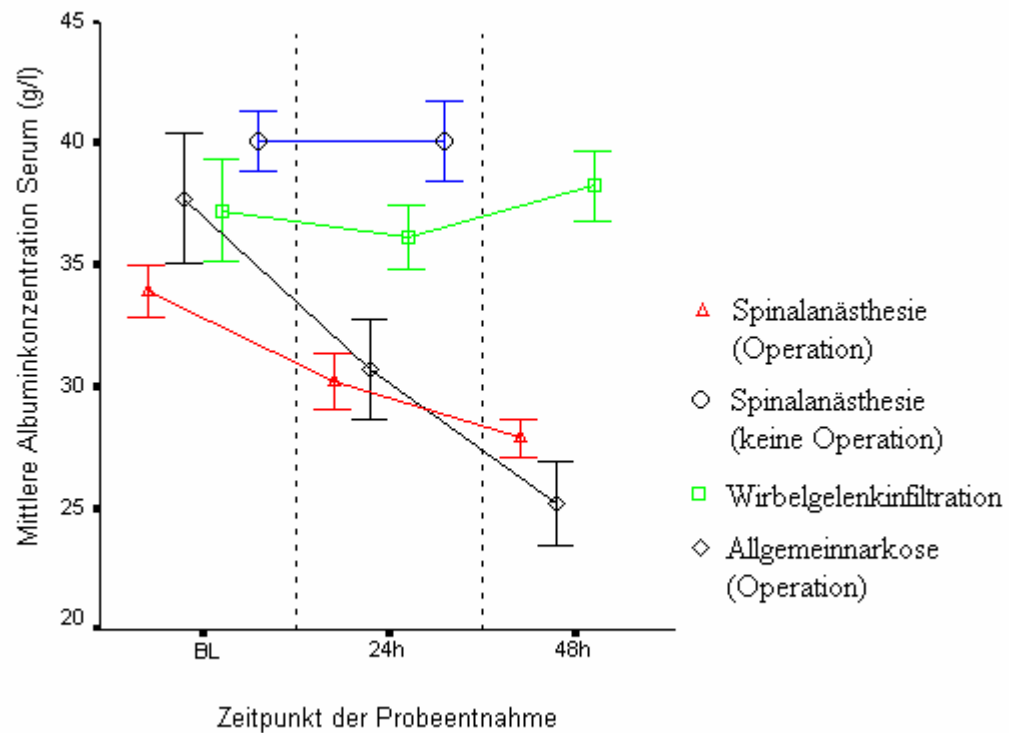


Abb. 23. Mittlere Albuminkonzentration im Serum (g/l) \pm SEM. Patientengruppen: Chirurgischer Eingriff unter Spinalanästhesie, Spinalanästhesie ohne chirurgischen Eingriff, Fassetgelenkinfiltration mit Bupivacain, Chirurgischer Eingriff unter Allgemeinnarkose. Probeentnahmen: vor Applikation von Bupivacain bzw. vor Einleitung der Allgemeinnarkose (baseline = BL), nach 24 Stunden (24h) und nach 48 Stunden (48h). Bei Spinalanästhesie ohne chirurgischen Eingriff wurde nur eine Verlaufskontrolle nach 24 Stunden durchgeführt.



Spinalanästhesie mit Bupivacain für operative Versorgung

Die Bupivacaindosierung variierte signifikant zwischen den einzelnen Patienten (Kruskal-Wallis-Test: χ^2 -Quadrat = 195,2; $p < 0,001$). Der partielle Einfluß des Faktors 'Patient' wurde mit 9,6% über den gesamten Zeitraum von 48 Stunden berechnet (Varianzkomponenten). In den ersten 24 Stunden der Untersuchung ergab sich ein partieller Einfluß des Faktors 'Patient' von 0,97%. Es bestand kein signifikanter Unterschied der Bupivacaindosierung in den Stunden 25 bis 48 (Kruskal-Wallis-Test: χ^2 -Quadrat = 11,0; $p = 0,98$). Korrelationstests konnten keine signifikante Beziehung zwischen der Summe der individuell applizierten Bupivacaindosis und den ermittelten Parameterdifferenzen über den Untersuchungszeitraum aufzeigen (Spearman-Korrelationskoeffizient; $p > 0,05$). Laboranalytische Ergebnisse wurden in Tab. 14 dargestellt.

Tab. 14. Mittelwerte \pm SEM der Parameter $AChE_{LU}$, $BChE_{LU}$, $BChE_{SE}$, $QBChE_{LU}$, GEW_{LU} , ALB_{LU} , ALB_{SE} und $QALB_{LU}$ gemessen über 48 Stunden bei Patienten unter Spinalanästhesie mit Bupivacain für operative Versorgung. Liquor- und Serumproben wurden vor der Applikation von Bupivacain entnommen (baseline = BL). Weitere Probeentnahmen erfolgten nach 24 Stunden (24h) und nach 48 Stunden (48h).

Zeitpunkt der Probeentnahme	$AChE_{LU}$ (nmol/min x ml)	$BChE_{LU}$ (nmol/min x ml)	$BChE_{SE}$ (nmol/min x ml)	$QBChE_{LU}$
BL	21,6 \pm 1,4	14,8 \pm 0,7	7932 \pm 320	1,9 \pm 0,1
24h	19,7 \pm 1,4	12,8 \pm 0,9	6253 \pm 319	2,1 \pm 0,2
48h	18,4 \pm 1,1	12,1 \pm 0,7	5430 \pm 286	2,3 \pm 0,2

Fortsetzung Tab. 14.

Zeitpunkt der Probeentnahme	GEW_{LU} (mg/l)	ALB_{LU} (mg/l)	ALB_{SE} (g/l)	$QALB_{LU}$
BL	369 \pm 21	183 \pm 10	34 \pm 1	5,5 \pm 0,3
24h	328 \pm 28	161 \pm 17	30 \pm 1	5,6 \pm 0,8
48h	296 \pm 14	145 \pm 9	28 \pm 1	5,2 \pm 0,3

Über den gesamten Testzeitraum wurden signifikant *sinkende AChE-Aktivitäten* im Liquor (Friedman-Test: $p = 0,021$) beobachtet.

Die Untersuchungsergebnisse stellen sich im Wilcoxon-Test zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten wie folgt dar:

$ACHE_{LU}BL$ zu $ACHE_{LU}24h$ signifikant $p = 0,031$

$ACHE_{LU}BL$ zu $ACHE_{LU}48h$ signifikant $p = 0,007$

$ACHE_{LU}24h$ zu $ACHE_{LU}48h$ nicht signifikant $p = 0,097$

Die mittlere *BChE-Aktivität im Serum* fiel signifikant während der gesamten Testperiode (Friedman-Test: $p < 0,001$).

Wilcoxon-Test zwischen den einzelnen Probeentnahmen:

$BCHE_{SE}BL$ zu $BCHE_{SE}24h$ signifikant $p < 0,001$

$BCHE_{SE}BL$ zu $BCHE_{SE}48h$ signifikant $p < 0,001$

$BCHE_{SE}24h$ zu $BCHE_{SE}48h$ signifikant $p = 0,003$

Die mittlere *BChE-Aktivität im Liquor* sank signifikant während der gesamten Testperiode (Friedman-Test: $p < 0,027$). Der BChE-Quotient Liquor/Serum zeigte insgesamt ansteigende Werte (Friedman-Test: $p = 0,018$).

Wilcoxon-Test (einzelne Probeentnahmen):

$BCHE_{LU}BL$ zu $BCHE_{LU}24h$ signifikant $p = 0,013$

$BCHE_{LU}BL$ zu $BCHE_{LU}48h$ signifikant $p = 0,003$

$BCHE_{LU}24h$ zu $BCHE_{LU}48h$ nicht signifikant $p = 0,277$

$QBChE_{LU}BL$ zu $QBChE_{LU}24h$ nicht signifikant $p = 0,068$

$QBChE_{LU}BL$ zu $QBChE_{LU}48h$ ($2,3 \pm 0,2$) nicht signifikant $p = 0,003$

$QBChE_{LU}24h$ zu $QBChE_{LU}48h$ signifikant $p = 0,111$

Die mittlere *Gesamtproteinkonzentration im Liquor* sank signifikant nach der Operation (Friedman-Test: $p = 0,001$).

Die Untersuchungsergebnisse stellen sich im Wilcoxon-Test zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten wie folgt dar:

$GEW_{LU}BL$ zu $GEW_{LU}24h$ signifikant $p = 0,031$

$GEW_{LU}BL$ zu $GEW_{LU}48h$ signifikant $p = 0,001$

$GEW_{LU}24h$ zu $GEW_{LU}48h$ nicht signifikant $p = 0,113$

Fallende mittlere Albuminkonzentrationen im Serum (Friedman: $p = 0,007$) und Liquor (Friedman-Test: $p = 0,003$) wurden beobachtet, während der mittlere Albuminquotient Liquor/Serum nahezu unverändert blieb (Friedman-Test: $p = 0,898$).

Wilcoxon-Test zwischen den einzelnen Probeentnahmen:

$ALB_{SE}BL$ zu $ALB_{SE}24h$ signifikant $p = 0,002$

$ALB_{SE}BL$ zu $ALB_{SE}48h$ signifikant $p = 0,002$

$ALB_{SE}24h$ zu $ALB_{SE}48h$ nicht signifikant $p = 0,088$

$ALB_{LU}BL$ zu $ALB_{LU}24h$ nicht signifikant $p = 0,080$

$ALB_{LU}BL$ zu $ALB_{LU}48h$ signifikant $p = 0,002$

ALB_{LU}24h zu ALB_{LU}48h nicht signifikant $p = 0,308$

QALB_{LU}BL zu QALB_{LU}24h nicht signifikant $p = 0,670$

QALB_{LU}BL zu QALB_{LU}48h nicht signifikant $p = 0,691$

QALB_{LU}24h zu QALB_{LU}48h nicht signifikant $p = 0,979$

Die Gesamtproteinkonzentration des Liquors korrelierte über den gesamten Untersuchungszeitraum signifikant ($p < 0,001$) mit der Albuminkonzentration im Liquor.

Intrathekale Bupivacainanästhesie ohne operativen Eingriff

Die mittleren Parameterdifferenzen zu unterschiedlichen Testzeiten korrelierten nicht mit den verabreichten Bupivacaindosierungen ($p > 0,05$ für alle getesteten Parameter). Die Ergebnisse der Laboranalysen sind Tab. 15 zu entnehmen.

Tab. 15. Mittelwerte \pm SEM der Parameter AChE_{LU}, BChE_{LU}, BChE_{SE}, QBChE_{LU}, GEW_{LU}, ALB_{LU}, ALB_{SE} und QALB_{LU} gemessen über 24 Stunden bei Spinalanästhesie mit Bupivacain zur Schmerzbehandlung. Liquor- und Serumproben wurden vor der Applikation von Bupivacain entnommen (baseline = BL). Eine weitere Probeentnahme erfolgte nach 24 Stunden (24h).

Zeitpunkt der Probeentnahme	AChE _{LU} (nmol/min x ml)	BChE _{LU} (nmol/min x ml)	BChE _{SE} (nmol/min x ml)	QBChE _{LU}
BL	20,9 \pm 1,9	22,1 \pm 2,2	8809 \pm 684	2,5 \pm 0,2
24h	20,5 \pm 1,7	22,9 \pm 3,2	8874 \pm 522	2,6 \pm 0,3

Fortsetzung Tab. 15.

Zeitpunkt der Probeentnahme	GEW _{LU} (mg/l)	ALB _{LU} (mg/l)	ALB _{SE} (g/l)	QALB _{LU}
BL	551 \pm 42	316 \pm 28	41 \pm 1	8,0 \pm 0,8
24h	527 \pm 49 mg/l	289 \pm 39	41 \pm 2	7,2 \pm 0,8

Der Wilcoxon-Test erbrachte bei keinem Parameter signifikante Unterschiede im Vergleich der Ausgangs- zu den 24-Stunden Werten:

GEW_{LU}BL zu GEW_{LU}24h nicht signifikant $p = 0,441$

ALB_{LU}BL zu ALB_{LU}24h nicht signifikant $p = 0,161$

ALB_{SE}BL zu ALB_{SE}24h nicht signifikant $p = 0,889$

QALB_{LU}BL zu QALB_{LU}24h nicht signifikant $p = 0,484$

ACHE_{LU}BL zu ACHE_{LU}24h nicht signifikant $p = 0,674$

BCHE_{LU}*BL* zu BCHE_{LU}*24h* nicht signifikant $p = 0,889$

BCHE_{SE}*BL* zu BCHE_{SE}*24h* nicht signifikant $p = 0,575$

QBChE_{LU}*BL* zu QBChE_{LU}*24h* nicht signifikant $p = 0,726$

Infiltrationsanästhesie arthrotisch veränderter Wirbelgelenke mit Bupivacain

Die Bupivacaindosierungen korrelierten im gesamten Untersuchungszeitraum nicht mit den mittleren Differenzen der BChE-Aktivitäten bzw. der mittleren Albuminkonzentrationen im Serum ($p < 0,05$). Über 48 Stunden waren die Unterschiede der BChE-Aktivitäten im Serum (Friedman-Test: $p = 0,368$) bzw. der Albuminkonzentrationen im Serum (Friedman-Test: $p = 0,174$) nicht signifikant. Die Ergebnisse der Laboranalysen sind Tab. 16 zu entnehmen.

Tab. 16. Mittelwerte \pm SEM der Parameter BChE_{SE} und ALB_{SE} gemessen über 48 Stunden bei Infiltration der Wirbelgelenke mit Bupivacain zur Schmerztherapie. Serumproben wurden vor der Applikation von Bupivacain entnommen (baseline = *BL*). Weitere Probeentnahmen erfolgten nach 24 Stunden (*24h*) und nach 48 Stunden (*48h*).

Zeitpunkt der Probeentnahme	BChE _{SE} (nmol/min x ml)	ALB _{SE} (g/l)
<i>BL</i>	8046 \pm 498	37 \pm 2
<i>24h</i>	7977 \pm 434	36 \pm 1
<i>48h</i>	8230 \pm 520	38 \pm 1

Die Untersuchungsergebnisse stellen sich im Wilcoxon-Test zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten wie folgt dar:

BCHE_{SE}*BL* zu BCHE_{SE}*24h* nicht signifikant $p = 0,569$

BCHE_{SE}*BL* zu BCHE_{SE}*48h* nicht signifikant $p = 0,501$

BCHE_{SE}*24h* zu BCHE_{SE}*48h* nicht signifikant $p = 0,469$

ALB_{SE}*BL* zu ALB_{SE}*24h* nicht signifikant $p = 0,737$

ALB_{SE}*BL* zu ALB_{SE}*48h* nicht signifikant $p = 0,352$

ALB_{SE}*24h* zu ALB_{SE}*48h* signifikant $p = 0,039$

Operative Versorgung unter Allgemeinnarkose ohne Bupivacaingabe

Über den gesamten Untersuchungszeitraum sanken die BChE-Aktivitäten im Serum signifikant (Friedman-Test: $p = 0,001$). Die Albuminkonzentrationen im

Serum fielen ebenfalls signifikant (Friedman-Test: $p = 0,003$). Die Ergebnisse der Laboranalysen wurden in Tab. 17 dargestellt.

Tab. 17. Mittelwerte \pm SEM der Parameter $BChE_{SE}$ und ALB_{SE} gemessen über 48 Stunden bei Patienten, die zur operativen Versorgung eine Allgemeinnarkose erhielten. Serumproben wurden vor der Einleitung der Narkose entnommen (baseline = *BL*). Weitere Probeentnahmen erfolgten nach 24 Stunden (*24h*) und nach 48 Stunden (*48h*).

Zeitpunkt der Probeentnahme	$BChE_{SE}$ (nmol/min x ml)	ALB_{SE} (g/l)
<i>BL</i>	7518 ± 572	38 ± 3
<i>24h</i>	5941 ± 706	31 ± 2
<i>48h</i>	5000 ± 668	25 ± 2

Die Untersuchungsergebnisse zum Zeitpunkt der einzelnen Probeentnahmen wurden mit dem Wilcoxon-Test verglichen:

$BChE_{SEBL}$ zu $BChE_{SE24h}$ nicht signifikant $p = 0,074$

$BChE_{SEBL}$ zu $BChE_{SE48h}$ signifikant $p = 0,005$

$BChE_{SE24h}$ zu $BChE_{SE48h}$ signifikant $p = 0,013$

ALB_{SEBL} zu ALB_{SE24h} signifikant $p = 0,017$

ALB_{SEBL} zu ALB_{SE48h} signifikant $p = 0,009$

ALB_{SE24h} zu ALB_{SE48h} signifikant $p = 0,028$

7.3 Diskussion

Bupivacain ist ein weit verbreitetes Lokalanästhetikum vom Amid-Typ. Das vom Blut- und Lymphsystem aufgenommene Medikament wird hauptsächlich in der Leber metabolisiert [118,172]. Kombinierte zentralnervöse und kardiovaskuläre Nebenwirkungen (Krampfanfälle, Arrhythmie bis zu Asystolie) bei Überdosierung oder versehentlicher intravaskulärer Gabe sind beschrieben worden [26,188]. Pathophysiologische Veränderungen verschiedener Gewebe unter dem Einfluß von Bupivacain wurden hauptsächlich in tierexperimentellen und in vitro-Studien analysiert. Coyle et al. [65] und Sanchez-Chapula [220] demonstrierten die Blockierung der langsamen Kalziumkanäle durch das Medikament am ventrikulären Herzmuskel des Meerschweins. Hall-Crags [106] wies die Zerstörung der Plasmamembran, des sarkoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien von Skelettmuskelzellen der Ratte durch 10^{-2} molare

Bupivacainlösung in vitro nach. Nonaka et al. [193] und Sadeh et al. [218] fanden, daß die Injektion von Bupivacain in den Skelettmuskel von Ratten eine massive Nekrose der Muskelfasern hervorruft. Nosaka [194] berichtete über einen signifikanten Aktivitätsanstieg der Kreatinkinase, der Aspartataminotransferase und der Alaninaminotransferase nach intramuskulärer Bupivacainapplikation bei Ratten. Er folgerte, daß es sich dabei um die Effekte von Zellzerstörungen in der frühen Phase einer Myonekrose handelt. Minamoto et al. [183] berichteten über Bupivacain-induzierte Hemmung der cGMP-Produktion in der glatten Muskulatur der Rattenaorta. Sturrock und Nunn [245] untersuchten die zytotoxische Wirkung des Medikamentes auf Kulturen von Lungenfibroblasten des Hamsters. Das Zellwachstum war gehemmt und die Überlebensrate herabgesetzt. Butterworth et al. [42] zeigten, daß Bupivacain eine Hemmung der cAMP-Synthese bei humanen Lymphozyten hervorruft. Pan et al. [202] konnten in Tierversuchen demonstrieren, daß die Aktivität sympathischer Nerven nach intrathekalen Gabe von Bupivacain signifikant abfällt.

Bupivacain kann strukturelle Veränderungen an *neuronalen* Zellen hervorrufen. Schädigungen an Neuronen des Rückenmarks (zytoplasmatische Vakuolisierung im Vorder- und Hinterhorn) nach mehrfacher intrathekalen Gabe von Bupivacain wurden in Tierversuchen durch Bahar et al. [20] nachgewiesen. Bisby [30] berichtete über eine Hemmung des axonalen Transportes peripherer Nerven durch langdauernde Bupivacainexposition (tierexperimentelle Arbeit). Kopeikina et al. [143] zeigten ebenfalls im Tierversuch, daß Bupivacain die neuronale Funktion durch Störung der Lipidstruktur synaptischer Membranen und Beeinflussung der membrangebundenen Enzyme (u.a. AChE) alterieren kann. In vorangegangenen Untersuchungen (Anhang 2) konnte eine in vitro-Hemmung der AChE-Aktivität des Liquors durch Bupivacain in Konzentrationen über 10^{-5} mol/l nachgewiesen werden [135].

Bupivacain beeinflußt die periphere Nervenleitung. *Intrathekal* appliziert hat das Medikament ungehinderten Zugang zum Myelon und zu Nervenwurzeln. Als *Infiltrationsanästhetikum* arthrotisch veränderter Wirbelgelenke sowie bei epiduraler Applikation gelangt Bupivacain in die direkte Umgebung der Meningen und Nervenwurzeln. Die Untersuchung der *AChE-Aktivität im Liquor* war an der Fragestellung orientiert, ob die sekretorische Aktivität enzymfreisetzender nervaler Zellen durch die intrathekale Applikation von

Bupivacain beeinflußt wird. Sollte Bupivacain den axonalen Transport hemmen [30] oder die Membranfunktion der freisetzenden Zellen schädigen [143], wäre der gesamte Sekretionsmechanismus der AChE und damit auch die meßbare AChE-Aktivität im Liquor verändert.

In dieser Studie konnten *signifikant erniedrigte* AChE-Aktivitäten im Liquor der unter spinaler Bupivacainanästhesie *operierten* Patienten gemessen werden. Es bestand jedoch keine Korrelation zwischen der Medikamentendosis und der sinkenden Enzymaktivität. Nach intrathekaler Bupivacaingabe *ohne* nachfolgende Operation blieb die AChE-Aktivität des Liquors *unverändert*. Aus den Untersuchungsergebnissen läßt sich ableiten, daß therapeutische Dosierungen von intrathekal verabreichtem Bupivacain prinzipiell keine signifikanten Aktivitätsänderungen der AChE im Liquor bewirken. Es ist damit anzunehmen, daß Bupivacain die sekretorische Aktivität der AChE-sezernierenden Zellen des Nervensystems *nicht* hemmt. Die nach Spinalanästhesie und *Operation* gemessenen Aktivitätserniedrigungen sind wahrscheinlich das Resultat einer anderweitig durch den chirurgischen Eingriff ausgelösten Sekretionshemmung der AChE-sezernierenden Zellen, deren Ursache wegen der Vielfältigkeit der Einflußgrößen aus den Daten dieser Studie nicht ermittelt werden konnte.

Theoretisch ließe sich eine Erniedrigung der AChE-Aktivität durch eine direkte Bupivacain-induzierte Hemmung in den untersuchten Proben erklären. In vitro-Versuche mit gereinigter AChE haben einen derartigen Hemmeffekt bei Bupivacainkonzentrationen über 10^{-3} mol/l gezeigt [21]. In vorangegangenen in vitro-Studien (Anhang 2) wurde jedoch weniger als 5% Hemmung der AChE-Aktivität bei Bupivacainkonzentrationen unter 10^{-4} mol/l nachgewiesen [135]. Die in pharmakologischen Untersuchungen gemessenen Bupivacainkonzentrationen im Liquor lagen bei 597 ± 355 µg/ml (entspricht 2×10^{-3} mol/l in angenommenen 15 ml lumbalem Liquorvolumen) 2 Minuten nach intrathekalen Gabe von 15 mg Bupivacain und bei 162 ± 68 µg/ml (entspricht $5,7 \times 10^{-4}$ mol/l in angenommenen 15 ml lumbalem Liquorvolumen) nach 20 Minuten [74]. Meyer und Nolte [176] ermittelten 7 µg/ml (entspricht $2,4 \times 10^{-5}$ mol/l in angenommenen 15 ml lumbalem Liquorvolumen) 10 Stunden nach Applikation von 15 mg Bupivacain intrathekal. Nach den Ergebnissen dieser Untersuchung kann man im Liquor der unter den *vorliegenden Versuchsbedingungen* untersuchten Patienten eine maximale Bupivacainkonzentration von 5×10^{-6} mol/l als 24-Stunden-Wert und

von 4×10^{-6} mol/l nach 48 Stunden erwarten (in angenommenen 15 ml Liquor, initiale Dosis: 15 mg Bupivacain, weitere kontinuierliche Gabe von 3,75 mg/h über 48 Stunden). Die Konzentration des Medikamentes im Liquor der unter Spinalanästhesie operierten Patienten liegt damit zu beiden Untersuchungszeitpunkten *unter* 10^{-5} mol/l. Eine äquivalente Feststellung kann man für nicht operierte Patienten nach einmaliger intrathekalen Bupivacaingabe von 5 - 15 mg treffen. Somit ist eine direkte Hemmung der AChE-Aktivität durch die Bupivacaingehalte in den untersuchten Liquorproben unwahrscheinlich.

Operative Eingriffe unter spinaler Anästhesie mit Bupivacain induzierten signifikant erniedrigte Serum- und Liquoraktivitäten der BChE, während Spinalanästhesie mit Bupivacain ohne Operation keine derartigen Veränderungen hervorrief. Die Serum-BChE-Aktivität blieb ebenso nach periartikulären Infiltrationen der lumbosakralen Wirbelgelenke unbeeinflusst. Andererseits bedingte ein operativer Eingriff unter Allgemeinnarkose eine erniedrigte Serum-BChE-Aktivität. Diese Beobachtungen führen zu der Hypothese, daß *nicht das Medikament Bupivacain*, sondern die mit der operativen Intervention verbundenen regulatorischen Veränderungen für erniedrigte BChE-Aktivitäten verantwortlich zu machen sind. Niedrige Plasmacholinesteraseaktivitäten nach Trauma wurden bereits von Ostergaard et al. [201] beschrieben.

In der vorliegenden Studie wurde ein signifikant erhöhter BChE-Quotient Liquor/Serum nach Operation unter Spinalanästhesie ermittelt, wobei die *BChE-Aktivität* in beiden Kompartimenten sank. Die Erniedrigung im Serum war jedoch relativ stärker als im Liquor. Dieses Erkenntnis deutet auf eine primäre Serumveränderung und verzögerte Gleichgewichtseinstellung des Blut-Liquor-schrankenbezogenen BChE-Anteils zwischen Serum und Liquor hin. Eine verminderte Enzymsekretion durch ZNS-Zellen (nicht schrankenbezogener Anteil), welche dem Medikament bei der Spinalanästhesie direkt ausgesetzt sind, ist zwar nicht auszuschließen, aber im Umfang eher gering.

Auffällig waren die unterschiedlichen Ausgangswerte (*BL*) der BChE-Aktivität in den beiden Patientengruppen, welche eine Spinalanästhesie erhielten. Hinsichtlich der Patientencharakteristika ergab sich auf den ersten Blick keine Ursache für die höheren Baseline-Werte in der Gruppe mit intrathekalen Bupivacainapplikation zur Schmerzbehandlung. Die Anamnese eingenommener Pharmaka vor der ersten

Lumbalpunktion unterschied sich nicht wesentlich. Betrachtet man jedoch die Ergebnisse der Untersuchungen zu BChE-Aktivitäten im Liquor bei Patienten mit degenerativen Lendenwirbelsäulenschäden, so läßt sich feststellen, daß gerade diese Erkrankungen als Indikation für die intrathekale Schmerzbehandlung in der Patientengruppe der Bupivacainstudie galten. Die höheren Ausgangswerte der BChE-Aktivität sind somit wahrscheinlich durch die vorliegende Pathologie (chronischer Rückenschmerz assoziiert mit degenerativen Lendenwirbelsäulenschäden) erklärbar. Diese Hypothese wird untermauert durch die ebenfalls hohen Ausgangswerte der mittleren Albuminquotienten und des Gesamteiweißes. Andererseits könnten die hohen Baseline-Werte im Sinne von zufällig in dieser Population gemessenen hohen BChE-Aktivitätsspiegeln (hohe interindividuelle Variabilität der BChE-Aktivitäten in Liquor und Serum) interpretiert werden. Die Patientenzahlen dieser Studie sind relativ klein, so daß eine statistische Bearbeitung dieser Fragestellung wenig erfolgversprechend erschien.

Patienten, welche unter Spinalanästhesie mit Bupivacain operiert wurden, zeigten eine signifikante Erniedrigung der mittleren *Gesamtprotein- und Albuminkonzentrationen im Liquor* nach dem chirurgischen Eingriff. Die Liquorveränderungen scheinen ebenfalls sekundärer Natur zu sein, da gleichgerichtete Alterationen der Serum-Albuminkonzentration beobachtet wurden. Die plausibelste Hypothese zur Erklärung der biochemischen Abweichungen ist eine primäre Sekretionsminderung in das Serum während und nach der Operation mit nachfolgenden - das Gleichgewicht zum Serum erhaltenden - Liquorveränderungen, vermittelt durch eine intakte (unveränderter Albuminquotient Liquor/Serum) Blut-Liquor-Schranke. Signifikant erniedrigte mittlere Serum-Albuminkonzentration wurden auch bei Patienten gefunden, welche unter Allgemeinnarkose operiert wurden. Korrelationsanalysen konnten keinen direkten Zusammenhang zwischen Bupivacaindosierungen und den gemessenen Parameterdifferenzen darstellen. Nach Spinalanästhesie *ohne* operativen Eingriff traten keine signifikanten Veränderungen der Albuminkonzentrationen im Serum oder Liquor auf. Lokale Bupivacain-Infiltrationsanästhesie an degenerativ veränderten lumbosakralen Wirbelgelenken bewirkte keine Änderung der Albuminkonzentration im Serum. Es ist deshalb *nicht* anzunehmen, daß ein direkter Bupivacaineffekt für niedrigere

Albuminkonzentrationen in der unter Spinalanästhesie operierten Patientengruppe verantwortlich ist.

In der vorliegenden Studie konnten entzündliche Reaktionen auf Lumbalpunktionen mit oder ohne Anlage von intrathekalen Kathetern ausgeschlossen werden. Die Leukozytenzahlen im Liquor waren in allen untersuchten Proben normal. Intrathekale Immunglobulinsynthesen wurden nicht diagnostiziert.

Die Patienten dieser Studie erhielten je nach individueller Behandlung folgende zusätzliche *systemische Medikation*: Acetylcystein, Allopurinol, Atropin, Kalziumsalze, Captopril, Carbamazepin, Cefuroxim, Chlordiazepoxid, Cilazapril, Cinnarizin, Diclofenac, Digitoxin, Dimetindenmaleat, Doxepin, Droperidol, Enalapril, Fenoterol, Fentanyl, Fluvastatin, Furosemid, Glibenclamid, Glyceroltrinitrat, Heparin, Hydrochlorothiazid, Insulin, Ipratropiumbromid, Isofluran, Isosorbiddinitrat, Lisinopril, Loratadin, Metformin, Metoclopramid, Midazolam, Moclobemid, Morphinsulphat, Lachgas, Nadroparin, Naloxon, Natriumfluorid, Nifedipine, Nitrazepam, Nitrendipin, Pentaerythrityltetranitrat, Phytosterol, Piritramid, Piroxicam, Prednisolon, Propranolol, Propofol, Ranitidin, Spironolacton, Suxamethonium, Tamoxifen, Theophyllin, Thyroxin, Triamteren, Torasemid, Verapamil, Vitamine (B1, B6, B12, E) und Zolpidemtartrat. Prilocain wurde zur Oberflächenanästhesie bei Lumbalpunktionen verwendet.

Einige dieser Pharmaka waren bereits in den Untersuchungen zur Referenzwertbestimmung der AChE auf mögliche Hemmeffekte der *AChE-Aktivität des Liquors in vitro* getestet worden (siehe Abschnitt 4.4).

Metoclopramid, Dimetinden und Prilocain entfalteten eine inhibitorische Wirkung auf die *in vitro*-AChE-Aktivität in Konzentrationen größer als 10^{-6} mol/l.

Verapamil, Droperidol und Midazolam mußten Konzentrationen über 10^{-5} mol/l in den untersuchten Proben aufweisen, um wirksam zu sein. Atropin, Cefotaxime, Digitoxin, Furosemid, Heparin, Morphin, Prednisolon, Suxamethonium und Theophyllin bewirkten keine Hemmung der AChE-Aktivität in Konzentrationen zwischen 10^{-7} und 10^{-4} mol/l. Die wenig wahrscheinliche Wirkung von Ranitidin auf die AChE-Aktivität im Liquor wurde im Abschnitt 4.5 diskutiert.

Wenige Publikationen existieren über die Wirkungen von o.g. Medikamenten auf die *BChE-Aktivität*. Holmes et al. [112] berichtete über eine 15%-ige Hemmung

der Plasmacholinesteraseaktivität durch Nitrazepam (10^{-3} mol/l) in vitro. Die in vitro Wirkung von Metoclopramid auf das Serumenzym wurde im Abschnitt 5.5 besprochen. Ranitidin hat in therapeutischen Dosierungen in vivo offensichtlich keinen Einfluß auf die BChE-Aktivität des Serums [126,219,275].

Die in vitro-Hemmversuche mit den genannten zusätzlichen Pharmaka erlauben Schlußfolgerungen auf in vivo-Effekte nur unter der Voraussetzung, daß ihre Konzentrationen in Geweben und Körperflüssigkeiten bekannt sind und denen aus in vitro-Hemmkinetiken entsprechen. Solche Konzentrationen dürften jedoch in vivo nicht erreicht werden.

7.4 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war die Analyse der Wirkung von Bupivacain auf Cholinesteraseaktivitäten, Gesamtprotein- und Albuminkonzentration im Serum und Liquor cerebrospinalis.

Vier orthopädische Patientengruppen gegliedert nach operativer (Spinalanästhesie mit Bupivacain oder Allgemeinnarkose) und minimalinvasiver Therapie (intrathekale Schmerztherapie oder Infiltrationsanästhesie mit Bupivacain) wurden untersucht.

Signifikante Korrelationen zwischen Bupivacaindosierungen und Parameterveränderungen bestanden generell nicht.

Signifikant erniedrigte AChE-Aktivitäten im Liquor der unter spinaler Bupivacainanästhesie operierten Patienten konnte auf regulatorische Mechanismen infolge des chirurgischen Eingriffes zurückgeführt werden. Nach intrathekaler Bupivacaingabe ohne nachfolgende Operation blieb die AChE-Aktivität des Liquors unverändert. Eine direkte Hemmung der AChE-Aktivität auf molekularer Basis durch Bupivacain in den untersuchten Liquorproben ist nicht wahrscheinlich. Es ist anzunehmen, daß Bupivacain die sekretorische Aktivität der AChE-sezernierenden Zellen des Nervensystems nicht hemmt.

Operative Eingriffe unter spinaler Anästhesie mit Bupivacain induzierten signifikant erniedrigte Serum- und Liquoraktivitäten der BChE, während Spinalanästhesie mit Bupivacain ohne Operation keine derartigen Veränderungen hervorrief. Die Serum-BChE-Aktivität blieb ebenso nach periartikulären

Infiltrationen der lumbosakralen Wirbelgelenke unbeeinflusst. Andererseits bedingte ein operativer Eingriff unter Allgemeinnarkose eine erniedrigte Serum-BChE-Aktivität. Da die Erniedrigung der BChE-Aktivität im Serum relativ stärker als im Liquor war, wurde eine primäre Serumveränderung und sekundäre Liquoranpassung angenommen. Diese Ergebnisse führen zu der Schlußfolgerung, daß nicht das Medikament Bupivacain, sondern die mit der operativen Intervention verbundenen regulatorischen Effekte für erniedrigte BChE-Aktivitäten verantwortlich zu machen sind.

Patienten, welche unter Spinalanästhesie mit Bupivacain operiert wurden, zeigten eine signifikante Erniedrigung der mittleren Gesamtprotein- und Albuminkonzentrationen im Liquor nach dem chirurgischen Eingriff. Die Liquorveränderungen scheinen sekundärer Natur zu sein, da gleichgerichtete Alterationen der Serum-Albuminkonzentration beobachtet wurden. Signifikant erniedrigte mittlere Serum-Albuminkonzentration wurden auch bei Patienten gefunden, welche unter Allgemeinnarkose operiert worden waren. Nach Spinalanästhesie ohne operativen Eingriff und nach lokaler Bupivacain-Infiltrationsanästhesie an Wirbelgelenken traten keine signifikanten Veränderungen der Albuminkonzentrationen im Serum bzw. Liquor auf. Es ist deshalb nicht anzunehmen, daß ein direkter Bupivacaineffekt für niedrigere Albuminkonzentrationen in der unter Spinalanästhesie operierten Patientengruppe verantwortlich ist.

Der Albuminquotient Liquor/Serum war nach intrathekaler Gabe von Bupivacain generell unverändert. Die Blut-Liquor-Schranke blieb somit nach intrathekaler Bupivacaingabe intakt.

Entzündliche Reaktionen auf Lumbalpunktionen mit oder ohne Anlage von intrathekalen Kathetern konnten ausgeschlossen werden. Intrathekale Immunglobulinsynthesen wurden nicht diagnostiziert.

Alterationen der untersuchten Parameter sind nicht auf Bupivacain, sondern auf regulatorische Anpassung im Rahmen der operativen Behandlung zurückzuführen. Die sekretorische Funktion Cholinesterase-freisetzender neuronaler Zellen wird durch therapeutische Dosierungen von Bupivacain nicht beeinflusst. Die Blut-Liquor-Schranke bleibt bei intrathekaler Bupivacainapplikation intakt.

8. Neue Aspekte zu Pathogenese und Therapie von Krankheitsbildern assoziiert mit degenerativen Veränderungen der lumbalen Wirbelsäule

Die Analyse der Cholinesteraseaktivitäten des Liquors ergab neue Details zur Aufklärung der Pathogenese von Lumboischialgie und neurologischen Ausfallserscheinungen bei degenerativen Schäden der Lendenwirbelsäule. Weitere Einsichten hinsichtlich krankheitsbezogener Alteration der Blut-Liquor-Schrankenfunktion wurden erarbeitet.

Die im Rahmen degenerativer Lendenwirbelsäulenschäden beobachtete *AChE-Aktivitätserhöhung im Liquor* ist als Folge einer *gesteigerten Sekretion* aus anatomisch relevanten, AChE-tragenden Neuronen zu betrachten. Es ist zu diskutieren, ob es sich dabei um einen regulatorischen Mechanismus im Sinne einer *gezielten Reizantwort* und/oder um eine unspezifische *inflammatorisch bedingte Hypersekretion* aus betroffenen Neuronen handelt.

Da als neuronale Quellen der AChE-Liquoraktivitäten sowohl cholinerge (Lokalisation im synaptischen Spalt), als auch katecholaminerge Neurone (Lokalisation auf Dendriten), möglicherweise auch sogenannte Liquorkontaktneurone beider Transmitterkategorien (Neuriten im Hirn und Rückenmark an Oberflächen der Basalmembranen oder an Gefäßen, Dendriten in Grenzstrukturen zum Liquorraum [158]) in Frage kommen, resultieren die Liquoraktivitäten aus der Expression und Sekretion des Enzyms nicht nur im Rahmen seiner Funktion als Terminator der cholinergen Transmission, sondern auch im Rahmen seiner Modulatorfunktionen nicht-cholinergen Systeme [11].

Wie sind aus dieser Sicht und den vorliegenden Befunden die beiden o.g. Varianten - gezielte Reizantwort und/oder unspezifische inflammatorisch bedingte AChE-Hypersekretion - zu beurteilen?

Aus anatomischer Sicht alterieren knöcherne und bindegewebige Strukturen die Cauda equina (ventrale und dorsale Anteile der Nervenwurzeln), das Spinalganglion und die vereinten Anteile der Nervenwurzeln. Es handelt sich also in erster Linie um Axone motorischer, sensibler und sympathischer/parasympathischer Neurone. Bei weit lateral liegenden

Bandscheibenvorfällen und Wirbelgelenkarthrosen sind zusätzlich die Somata sensibler Nervenzellen im Spinalganglion betroffen. In den radikulären axonalen Strukturen [27,142,282] wie auch in den Zellsomata [88,195,249] wurde AChE identifiziert, welche bei entsprechender zellulärer Stimulation in den Extrazellularraum und damit in den Liquor cerebrospinalis sezerniert werden kann. Nur in den Spinalganglien finden sich Synapsen, die AChE im Rahmen der cholinergen Transmission hauptsächlich membrangebunden exprimieren [141]. Man kann deshalb davon ausgehen, daß die Liquoraktivität der AChE weniger aus Alterationen des Enzyms im cholinergen Transmissionssystem allein, als vielmehr auch aus funktioneller Aktivierung einer umfassenderen Sekretion aus nicht-cholinergen Systemen hervorgeht [11]. Die im Rahmen degenerativer Lendenwirbelsäulenschäden beobachtete AChE-Aktivitätserhöhung im Liquor ist also mindestens anteilig als gezielte Reizantwort auf eine *direkte Stimulation betreffender nervaler Zellfunktion* zu betrachten.

Neuronale Fehlfunktion und AChE-Aktivitätserhöhung scheinen in einem direkten Zusammenhang zu stehen, was aus der dargestellten Relation der Enzymaktivität zu neurologischen Ausfallserscheinungen abzuleiten ist. Diese Erkenntnis sollte jedoch *nicht* zu der Schlußfolgerung führen, daß eine individuelle, vom Normalwert abweichende AChE-Aktivität im Liquor definitiv auf eine ablaufende neuronale Degeneration in Nervenwurzelfasern hinweist. Ausgehend vom mechanischen Konzept der Schädigung müßte die Nervenwurzel im Bereich der lateralen Wurzeltasche dem potentiell größten äußeren Druck ausgesetzt sein. Hypothetisch wäre bei Einengungen in diesem Bereich der umfangreichste nervale Schaden, gekoppelt mit der prägnantesten AChE-Aktivitätserhöhung, zu finden. Die vorliegenden Untersuchungen bestätigten tatsächlich eine von der Lokalisation der Wurzelalteration abhängiges Ausmaß der Enzym-Aktivitätserhöhung. Da jedoch auch bei geringerer nervaler Kompression (mediale Engpässe) eine AChE-Erhöhung vorliegt, sind neben der externen mechanischen Druckwirkung auf den Nerv *weitere* Noxen als funktionsschädigendes Agens zu vermuten. Es handelt sich also offensichtlich um ein *komplexes* Geschehen aus perineuraler *und* endoneuraler Alteration.

Einer der wichtigsten Hinweise auf biologische Veränderungen, die nicht allein durch histologische Befunde nachweisbar sind, gaben Cornefjord et al. [62]. Die Autoren applizierten in einer Versuchsserie autologen Nucleus pulposus auf die

S1-Wurzel von Schweinen und untersuchten die Folgen zusätzlicher Kompression. Histologisch nachweisbare axonale Schäden fanden sich nur bei Nerven, die komprimiert worden waren. Die Nervenleitgeschwindigkeit war jedoch bei allen Nervenwurzeln *unabhängig* von zusätzlicher Druckwirkung herabgesetzt. Erstaunlicherweise war diese funktionelle Schädigung auch an der kontralateralen, primär *nicht operierten* Nervenwurzel nachweisbar. Die Autoren folgerten aus diesen Befunden, daß die morphologische Basis für funktionelle Nervenschädigungen auf *subzellulärem* Niveau zu suchen sei.

Das quantitative Ausmaß einer Beteiligung von ebenfalls AChE enthaltenden Liquorkontaktneuronen an einer vermehrten AChE-Sekretion ist nach dem derzeitigen Kenntnisstand nicht abzuschätzen.

Ob eine gesteigerte AChE-Aktivität im Liquor auf Enzymfreisetzung aus *glialen oder meningealen* Zellen beruht, ist wegen der relativ geringen potentiellen Fähigkeit dieser Zellen zur AChE-Sekretion fragwürdig. Gänzlich auszuschließen ist ein solcher Herkunftsort jedoch nicht, wenn man die Erkenntnisse von Ummenhofer et al. [257] zum AChE-Gehalt der Meningen und die Untersuchungen von Wright et al. [277] zur AChE-Freisetzung aus glialen Zellen in Erwägung zieht. Besonders die Dura steht räumlich in enger Beziehung zu den potentiell druckauslösenden Strukturen.

Zahlreiche Anhaltspunkte sprechen dafür, daß die im Rahmen der Verschleißerscheinungen der Lendenwirbelsäule ermittelten AChE-Aktivitätserhöhungen im Liquor auch durch eine *unspezifische entzündliche Hypersekretion* bedingt sein können.

Für letztere Hypothese sprechen die Erkenntnisse von Rydevik et al. [217] über Hemmung des axonalen Transportes, bedingt durch ein endoneurales Ödem. Die Freisetzung der AChE in den Extrazellularraum bzw. Liquor wäre nach dieser Hypothese die Folge einer lokalen Anhäufung des Proteins an der Kompressionsstelle des Axons und transmembraner Enzymfreisetzung - also eine Art Entlastung des axonalen Innendrucks.

Entzündungen an der Nervenwurzel können offensichtlich durch chemische Noxen ausgelöst werden, was zunächst durch die *kompressionsfreie* Transposition von Nucleus pulposus-Gewebe in den Bereich der Nervenwurzeln belegt werden konnte. Byrod et al. [46] zeigten am Tiermodell, daß epidurale

Entzündungsreaktionen und minimale axonale Schädigungen bereits in den ersten 3 Stunden nach Applikation von Nucleus pulposus auch ohne Kompression der Nervenwurzel auftreten. Satoh et al. [221] folgerten, daß ein als fremd erkanntes Gewebe - in diesem Falle Nucleus pulposus - eine immunologische Reaktion auslösen muß. Die Autoren wiesen *Antigen-Antikörper-Komplexe* in degenerierten, jedoch nicht in gesunden Bandscheiben nach.

Olmarker und Rydevik [199] äußerten die Vermutung, daß Substanzen, welche dem Nucleus pulposus entstammen, eine signifikante nervale Funktionsstörung wie auch eine Sensibilisierung der Nerven bewirken. Olmarker und Larsson [196] identifizierten *TNF α* als eine solche potentiell schädigende Substanz, welche von kultivierten Nucleus pulposus-Zellen freigesetzt wird. In einem weiteren Versuchsansatz transplantierten die Autoren autologes Bandscheibengewebe auf Nervenwurzeln von Schweinen. Die Nervenleitgeschwindigkeit war bei diesen Tieren herabgesetzt. Wenn transplantiertes Bandscheibengewebe lokal mit monoklonalem Antikörper gegen *TNF α* behandelt wurde, ergab sich eine verminderte Herabsetzung der Nervenleitgeschwindigkeit. Diese Versuchsergebnisse lassen auf eine direkte Beziehung von *TNF α* -Freisetzung und funktionellen Schäden am Nerven schließen. Diese Untersuchungen konnten ebenfalls zeigen, daß Nucleus pulposus-Gewebe bei experimentellen Modellen an der Nervenwurzel eine *endoneurale Ödembildung* auslöst. Auch in diesen Mechanismus scheinen Entzündungsmediatoren (u.a. *TNF α*) einbezogen zu sein. Weitere Untersuchungen zur Hemmung von *TNF α* [197] waren zwar bisher hinsichtlich einer möglichen therapeutischen Anwendung nicht überzeugend positiv, bestätigten jedoch die Bedeutung einer *biologisch* orientierten Herangehensweise an die multifaktorielle Pathologie bei degenerativen Erkrankungen der Wirbelsäule.

Stickoxid, ein potenter Entzündungsmediator ist beteiligt an der Regulation der Durchblutung, der Neurotransmission und Initiation neuropathischer Schmerzen. Die Stickoxidsynthese wird durch das Enzym Stickoxidsynthetase katalysiert. Brisby et al. [37] fanden, daß Nucleus pulposus-Gewebe die Aktivität der Stickoxidsynthetase erhöht bzw. daß Hemmung dieses Enzyms die endoneurale Ödembildung reduziert und die Herabsetzung der Nervenleitgeschwindigkeit vermindert. Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, daß Stickoxid in die

pathophysiologischen Reaktionen einbezogen ist, welche durch einen Bandscheibenvorfall ausgelöst werden.

Lidslot et al. [162] fanden durch in vitro Versuche an kultivierten Spinalganglienzellen neugeborener Ratten einen weiteren axonotoxischen Effekt von Nucleus pulposus-Gewebe: die *Blockade* des axonalen Wachstums. Diese Wirkung wäre für die Regeneration der durch einen Bandscheibenvorfall betroffenen Nervenwurzel potentiell negativ und würde eine bald mögliche Entfernung des degenerierten Bandscheibengewebes bzw. eine Hemmung der von diesem Gewebe ausgehenden Entzündungsreaktion als therapeutische Maßnahme ratsam erscheinen lassen.

Die vorliegenden Studien zeigen, daß radikuläre Alterationen durch Analyse der AChE-Aktivität im Liquor cerebrospinalis nachgewiesen werden können. Die Untersuchungsergebnisse können als Indiz dafür gewertet werden, daß bei den untersuchten Wirbelsäulenschäden eine kompressionsbedingte Zerstörung neuronaler Gewebe nicht das einzige Korrelat der Schädigung einer Nervenwurzel ist. Gesteigerte funktionelle Aktivität der beteiligten *vitalen* neuronalen Systeme stellt offensichtlich eine charakteristische Reaktion auf mechanische und chemische Alteration nervaler Strukturen dar. Hypothetisch kann angenommen werden, daß die *funktionelle Aktivierung der neuronalen Zellen eine unmittelbare Folgeerscheinung schädigender Einflüsse an der Nervenwurzel* ist, während klinisch nachweisbare *neurologische Defizite als Zeichen bereits einsetzender destruktiver Prozesse* gewertet werden können. Diese Hypothese würde die oft unvollständige Restitution nervaler Funktion nach verzögert durchgeführter operativer Dekompression zumindest teilweise erklären und eine weniger strikt an den Nachweis neurologischer Defizite gebundene Operationsindikation rechtfertigen.

Eine ebenfalls unspezifische axonale Reaktion könnte die unkontrollierte Proteinfreisetzung durch lokale Zerstörung der Zellmembran im Rahmen *neuronaler Degeneration* sein. Durch experimentelle Kompression von Spinalnervenwurzeln konnten zwar histologische Anzeichen einer axonalen Schädigung, jedoch keine regelrechten degenerativen Vorgänge nachgewiesen werden [217]. Für massiven neuronalen Zelltod mit konsekutiver Freisetzung der Cholinesterasen aus den zerstörten Zellen besteht auch nach den Ergebnissen der

vorliegenden Untersuchungen *kein* Anhalt. Ein solcher Prozeß würde im Liquor eine meningitische/neuritische Reaktion mit erhöhten Leukozytenkonzentrationen und vermutlich auch intrathekalen Immunglobulinsynthese auslösen können. Derartige Befunde lagen bei keinem der hier untersuchten Liquores vor. Auch Skouen et al. [237] konnten nach experimenteller Kompression bzw. Nucleus pulposus-Exposition von Nervenwurzeln keine oligoklonalen Banden im Liquor nachweisen.

Die im Zusammenhang mit lumbalen Wirbelsäulenschäden gefundenen Erhöhungen der Cholinesteraseaktivitäten sind nach den bisher dargestellten Befunden am ehesten als lokal begrenzte Freisetzungsprozesse zu erklären. Es ist anzunehmen, daß sich unter den vorliegenden pathologischen Bedingungen die *ventriculo-lumbalen Gradienten* der Cholinesterasen weiter zugunsten des lumbalen Aktivitätsniveaus verändern. Der Nachweis einer derartigen Gradientenverschiebung könnte die örtliche Eingrenzung nervaler sekretorischer Funktionssteigerung im Schädigungsareal bestätigen, woraus sich ein potentieller Untersuchungsansatz für tierexperimentelle Studien ergibt.

Die *Blut-Liquor-Schrankenstörung*, welche im Zusammenhang mit schmerzhaften Verschleißerscheinungen der Lendenwirbelsäule in den vorliegenden Studien beobachtet wurde, scheint pathogenetisch sowohl an morphologische Kriterien als auch an inflammatorisch ausgelöste Alterationen der meningealen/neuronalen Gefäße gebunden zu sein.

Eine hypothetische Erklärung der Permeabilitätssteigerung duraler Gefäße, welche zu der nachgewiesenen Blut-Liquor-Schrankenstörung bei Rückenschmerz in Beziehung gesetzt werden kann, ergibt sich aus den Erkenntnissen zur neurogenen Entzündung *duraler* Gefäße bei Migräne und Cluster-Kopfschmerz - typischen *vaskulären* Schmerzphänomenen [170]. Durale Gefäße werden von einem Netzwerk myelinisierter und nicht myelinisierter Nervenfasern umgeben [281]. Offensichtlich bestehen Verbindungen sensibler peripherer Nerven zur duralen Gefäßinnervation, wie Coffey und Rotheron [59] sowie Lance [153] anhand der Trigemini-assozierten nervalen Versorgung intrakranieller Duragefäße zeigen konnten. Diese perivaskulären Nervennetze enthalten vasodilatatorisch wirksames und neurogen permeabilitätssteigerndes Stickoxid [25]. Experimentell kann Proteinextravasation aus duralen Gefäßen durch chemische, elektrische und

immunologische Stimulation induziert werden [170]. Setzt man voraus, daß auch die *spinalen* duralen Gefäße ein ähnliches perivaskuläres Nervengeflecht mit Verbindung zu peripheren sensiblen Nerven haben, ließe sich auch in diesen Regionen ein *neurogener Entzündungsmechanismus der Gefäße bei nozizeptiver Stimulation* vermuten. Dieser wäre mit erhöhter Gefäßpermeabilität und Extravasation von Proteinen in den perivaskulären Raum/Liquor verbunden.

Byrod et al. [43] wiesen eine unmittelbare vaskuläre Verbindung zwischen *epiduralen* venösen Plexus und *intraneuralen* Kapillaren nach. Von Interesse sind in dieser Beziehung Untersuchungen zum Transfer von Makromolekülen aus epiduraler Lokalisation in den Endoneuralraum der Nervenwurzeln. Byrod et al. [45] fanden, daß Meerretichperoxidase innerhalb von 5 min nach epiduraler Gabe in den periaxonalen Arealen des Spinalganglions nachweisbar ist, wobei nicht geklärt werden konnte, ob die Übertragung per diffusionem oder auf vaskulärer Basis erfolgte. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen legen die Vermutung nahe, daß Substanzen aus epidural prolabierte Bandscheibengewebe die Axone der Spinalnervenwurzeln in kürzester Zeit erreichen. Die Autoren [44] demonstrierten im Tierversuch ebenfalls eine endoneurale vaskuläre *Permeabilitätssteigerung* nach lokaler Applikation von Nucleus pulposus in den epiduralen Bereich von Nervenwurzeln. Eine *endoneurale Entzündungsreaktion* ist somit als direkte Folge von Bandscheibenschäden anzunehmen.

Prinzipiell könnten folglich mindestens zwei pathophysiologische Mechanismen an der Entstehung einer Blut-Liquor-Schrankenstörung beteiligt sein: 1) die neurogene Entzündung duraler Gefäße und 2) die direkte endoneurale vaskuläre Permeabilitätssteigerung nach Zustrom von Entzündungsmediatoren aus epiduralen Gefäßen.

In den vorliegenden Studien wurde mit der *BChE* ein höher-molekularer (im Vergleich zu Albumin) Eiweißkörper untersucht, der sowohl Blut-Liquor-Schrankenstörungen, als auch alterierte neuronale Prozesse anzeigen kann. Es konnte nachgewiesen werden, daß die BChE-Aktivität des Liquors im Normalfall in entscheidendem Maße von der neuronalen Sekretion bestimmt wird, bei Patienten mit degenerativen Wirbelsäulenschäden jedoch ein verstärkter Einstrom aus dem Blut vorliegt. Diese Befunde über der BChE-Herkunft im Liquor unter normalen und pathologischen Bedingungen gehören ebenfalls zu den *neuen*

Erkenntnissen dieser Arbeit. Die beobachtete Erhöhung der BChE-Aktivität im Liquor zeigt, daß bei degenerativen spinalen Schäden sowohl eine Aktivierung neuronaler sekretorischer Aktivität *als auch* eine lokale Störung der Blut-Liquor-Schrankenfunktion vorliegen. Eine Wichtung beider Anteile ist nicht möglich, da die Relation der molekularen Formen G4/G1 nicht bekannt ist (diesbezügliche Untersuchungen wurden wegen des zu hohen Liquorbedarfs nicht durchgeführt). Eine mögliche Quelle der BChE im Liquor sind auch die Endothelien der Hirnkapillaren, in denen BChE als ein charakteristisches Enzym nachgewiesen werden konnte [209]. Wahrscheinlicher ist jedoch der Enzymeinstrom aus dem Blut, hervorgerufen durch neurogene bzw. direkt mediatorgesteuerte Entzündungsmechanismen der duralen und intraneuralen Gefäße.

Hinsichtlich der *Schmerzregulation* sei an die Fähigkeit des Enzyms AChE zur Hydrolyse der *Substanz P* erinnert [54]. Cornefjord et al. [60] komprimierten Spinalnervenzwurzeln proximal des Spinalganglions beim Schwein und fanden nach einer Woche eine signifikante Erhöhung der Konzentration von Substanz P im Ganglion wie auch in der Nervenwurzel. Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten eine basale Sekretion von Substanz P in Hinterhornneuronen, diese erhöhte sich bei experimentell erzeugter peripherer Gelenkentzündung [177]. Entzündung im peripheren Gelenk bedingt periphere Sensibilisierung (erhöhte Sensibilität nozizeptiver peripherer afferenter Neurone) und zentrale Sensibilisierung [262] (gesteigerte Exzitabilität nozizeptiver zentraler Neurone) [91,222]. Der Prozeß der Sensibilisierung ist offensichtlich die Grundlage der (spodyl-)arthritischen Schmerzen, welche als spontane Schmerzen (Ruheschmerz) und als Hyperalgesie (Belastungsschmerz) empfunden werden [222,174].

Auf Rückenmarksebene besteht eine enge Wechselwirkung zwischen akuten bzw. chronischen periphere Entzündungen und Prostaglandinfreisetzung in Hinterhornneuronen bzw. Spinalganglien [261]. Prostaglandine ihrerseits induzieren in afferenten nozizeptiven Neuronen eine verringerte Potentialschwelle, erhöhen die Rate der Aktionspotentiale und fördern die Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren, Substanz P und Calcitonin gene-related peptide sowie Stickoxid. Andererseits erhöhen Glutamat, Substanz P und Calcitonin gene-related peptide die Prostaglandinfreisetzung.

Die Hyperexzitabilität der Rückenmarksneurone wird durch verschiedene Transmitter-Rezeptor-Systeme erreicht, welche die synaptischen Aktivitäten der

Neurone beeinflussen. Der Schlüsseltransmitter ist Glutamat, welches N-methyl-d-aspartate- (NMDA-) and nicht-NMDA-Rezeptoren an Rückenmarksneuronen aktiviert. Eine Blockade dieser Rezeptoren verhindert bzw. vermindert die zentrale Sensibilisierung. Exzitatorische Neuropeptide (Substanz P und Calcitonin gene-related peptide) fördern die zentrale Sensibilisierung. Die zentrale Sensibilisierung wird auch durch Mediatoren mit komplexerer Wirkung gefördert, z.B. PGE 2. Spinales PGE 2 bindet an Rezeptoren präsynaptischer Endigungen primärer afferenter Neurone und beeinflusst so die synaptische Freisetzung von Transmittern. PGE 2 bindet ebenso an Rezeptoren der postsynaptischen spinalen Neurone. Die Gabe von PGE 2 auf die Oberfläche des Rückenmarkes verursacht Antwortreaktionen spinaler Neurone ähnlich derer bei peripherer Gelenkentzündung. Zusätzlich werden im Tierversuch Neurokinin 1 und Bradikinin 2 Rezeptoren bei akuter und chronischer peripherer Entzündung (Knie) in den lumbalen Spinalganglien beidseitig vermehrt exprimiert [230]. Die Neurokinin 1 Rezeptoren werden durch Substanz P aktiviert. Diese gesteigerte Rezeptorexpression ist für akute und chronische Schmerzen bei Entzündungen von Bedeutung. Es ist durchaus denkbar, daß die in den vorliegenden Studien gefundene gesteigerte Freisetzung von AChE eine regulatorische Antwort mit dem Ziel der *Verminderung von schmerzpotenzierender Substanz P* darstellt.

Die im Abschnitt 1.5.3 erwähnte Fragestellung, ob eine unter Schmerzbedingungen beobachtete Erhöhung der Acetylcholinkonzentration im Liquor [78,113] durch eine *erniedrigte* AChE-Aktivität bedingt sein könnte, muß nach den Erkenntnissen der vorliegenden Untersuchungen (erhöhte AChE-Aktivität bei Patienten mit Rückenschmerz) *verneint* werden. Generell müssen Zusammenhänge zwischen AChE-Aktivität und Acetylcholinkonzentration im Liquor wegen ihrer bedingungsabhängigen Komplexität kritisch bewertet werden. Es ist bekannt, daß Aktivierung spinaler cholinergischer Systeme offensichtlich einen analgetischen Effekt bewirkt. Beispielsweise werden cholinerge Liganden fest an Strukturen des Hinterhorns (Tierversuche) gebunden [231] und Mikroinjektionen von cholinergen Agonisten in das Hinterhorn von Ratten bewirken eine Hemmung der neuronalen Exzitation nach elektrischer Stimulierung [31]. Die intrathekale spinale Applikation von cholinergen Agonisten führt zu dosisabhängiger Analgesie im Tierversuch, welche durch muskarinerge Antagonisten aufgehoben werden kann [119,279]. Eine andere Möglichkeit, cholinerge Mechanismen im

Sinne spinaler Analgesie zu nutzen, schien die intrathekale Applikation von Cholinesteraseinhibitoren zu sein. Der Cholinesterasehemmer Neostigmin bewirkt, spinal verabreicht, eine dosisabhängige Analgesie beim Menschen, wie Hood et al. [114] in experimentellen klinischen Studien zeigen konnten.

Shafer et al. [232] fanden bei gesunden Probanden nach intrathekaler Applikation von Neostigmin (Bolusinjektionen von 50 bis 750 µg), eine Erhöhung der AcetylcholinKonzentration über das 5-fache der Ausgangskonzentration. Bei Berechnung der pharmakokinetischen Daten von Shafer et al. [232] ist anzunehmen, daß die verabreichten Neostigmindosierungen eine vollständige Hemmung der AChE und BChE im Liquor bewirkten und sich folglich ein neues Gleichgewicht der die AcetylcholinKonzentration bestimmenden Prozesse einstellte, welches als erhebliche Erhöhung der Transmitterkonzentration nachgewiesen wurde:

Bereits bei der niedrigsten intrathekalen Dosierung von 50 µg Neostigmin (Molekulargewicht 224) würde mit einem anfänglichen Verteilungsvolumen von 15 ml (lumbaler Liquorraum und angrenzende Extrazellularräume) eine Konzentration des Cholinesteraseinhibitors von etwa $1,3 \times 10^{-5}$ mol/l angeboten, was spontan eine totale Blockade der dortigen Enzymaktivität und damit des Abbaus alles eingeströmten Acetylcholins bedeuten würde. Die nach 60 Minuten immer noch gemessene Neostigminkonzentration von 100 - 300 µg/l Liquor, entsprechend etwa 10^{-6} mol/l verursacht immer noch eine mindestens 50 %-ige Hemmung der Cholinesterasen (Tab. 6). Bei höheren Dosierungen bis 750 µg Neostigmin sind noch ausgeprägtere und zeitlich länger andauernde Hemmeffekte zu erwarten. Die bei allen eingesetzten Neostigminkonzentrationen gemessene plateauförmige Erhöhung der Acetylcholinspiegel deutet daraufhin, daß die Cholinesterasen über einen längeren Zeitraum (Beobachtungszeitraum bis 800 Minuten) total gehemmt bleiben.

Das Einsetzen der *Analgesie* korrelierte in dieser referierten Untersuchung [232] jedoch *nicht* mit dem *Acetylcholinspiegel* sondern *mit der Neostigminkonzentration* im Liquor. Diese Korrelation zwischen Neostigminspiegeln und Analgesie in den unteren Extremitäten führt zu der Annahme, daß eine Hemmung der AChE bzw. BChE im Liquor mit der geringeren Schmerzempfindung in Zusammenhang stehen könnte. Die fehlende Korrelation der analgetischen Wirkung mit der AcetylcholinKonzentration wäre

damit eine überraschende Erkenntnis. Die zeitlich vor der einsetzenden Analgesie nachgewiesene Erhöhung der Acetylcholinkonzentration deutet somit darauf hin, daß die Transmitterkonzentration mit der beschriebenen direkten Hemmung der AChE im Liquorraum zusammenhängt, während die analgetische Wirkung offensichtlich durch andere Mechanismen ausgelöst wird. Betrachtet man die weite Verbreitung cholinergischer Bindungsstellen im Rückenmark [231], so ergibt sich wahrscheinlich ein kontinuierlicher Zustrom des Transmitters in den Liquor, ohne daß ein direkter Zusammenhang mit der lokalisierten Acetylcholinfreisetzung aus den Synapsen des Hinterhorns nachgewiesen werden kann.

Diese Erkenntnisse legen erneut die Vermutung nahe, daß die AChE bzw. BChE selbst eine schmerzmodulierende Funktion auf spinaler Ebene ausüben können, *ohne* daß ein direkter Zusammenhang zur cholinergen Transmission besteht.

Werden physiologische (medikamentös unbeeinflusste) Bedingungen zugrunde gelegt, ergibt sich für den Zusammenhang zwischen den Cholinesteraseaktivitäten und Acetylcholinkonzentration im Liquor das erstaunliche Phänomen, daß die Ausschüttung von Acetylcholin aus dem cholinergen System als dem *ausschließlichen* Ursprungsort in den Extrazellular- und Liquorraum *ohne* kompletten Abbau durch die dorthin mit ausreichenden Aktivitäten aus *multiplen* Quellen sezernierten Cholinesterasen vonstatten geht. Die Summe beider Cholinesteraseaktivitäten bewegt sich nach allen in der vorliegenden Arbeit zitierten Angaben (Kapitel 4 und 5) etwa zwischen 10 und 30 nmol/min x ml. Die Acetylcholinkonzentrationen von Kontrollpersonen liegen nach publizierten Untersuchungen bei Werten von 70 ± 20 pmol/ml [272], $35,8 \pm 10,2$ pmol/ml [130] bzw. $13,0 \pm 2,6$ pmol/ml [232]. Damit scheint also eine bis zu einer in vivo noch unbekannten oberen Grenzkonzentration im Liquor vorliegende Menge an Acetylcholin durch die endogenen Cholinesterasen *nicht* gespalten zu werden. Dies kann aus enzymkinetischer Sicht nur über ein „Nichtanspringen“ der Hydrolyse unterhalb dieser Grenzkonzentration und/oder über das Vorhandensein ausreichender Konzentrationen endogener inhibitorischer Faktoren der Cholinesterasen im Liquor gedeutet werden. Für diese Hypothese sprechen Verlaufsuntersuchungen der Acetylcholinspiegel und BChE-Aktivitäten in Liquores nach Subarachnoidalblutungen [130], welche zeigten, daß die BChE-Aktivitäten bereits nach 4 bis 10 Tagen auf Normalwerte abgesunken waren, die

AcetylcholinKonzentrationen aber nach 20 Tagen noch nicht den halben Mittelwert der Kontrollen erreicht hatten.

Mense [174] erwähnt in einer zusammenfassenden Arbeit eine bisher nicht bewiesene Hypothese zur Entstehung von chronischem Rückenschmerz. Diese geht vom *Zelltod inhibitorischer Interneurone* durch starke nozizeptive Reize im Rückenmark aus. Die Folge soll eine verminderte Hemmung der nozizeptiven Neuronen mit Chronifizierung von Schmerz sein. Wie bereits in anderem Zusammenhang erwähnt, wurden in den vorliegenden Untersuchungen keine Hinweise auf Zerstörung gefunden. Allerdings wären die entsprechend dieser Hypothese zerstörten Interneurone im Rückenmark cranial der Liquorpunktionsstelle lokalisiert und im zellulären Verbund des Hinterhorns integriert. Ein liquoranalytischer Nachweis begrenzter Zerstörung ist deshalb wahrscheinlich nicht möglich.

Die *symptomatische Behandlung von Schmerzen* bei Bandscheibenvorfällen mit potenten nichtsteroidalen antiinflammatorischen Medikamenten (NSAID) wird seit geraumer Zeit praktiziert. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, daß NSAID die entzündungsbedingte intraspinale Freisetzung von Substanz P innerhalb von einigen Stunden hemmen können [223]. Diese medikamentöse Wirkung scheint jedoch nicht initial, sondern auf längere Sicht von Bedeutung für die Behandlung zu sein. Corneford et al. [61] konnten im Tierexperiment geringere nervale Funktionseinschränkung (Nervenleitgeschwindigkeit) unter systemischer Diclofenac-Therapie nach Applikation von Nucleus pulposus-Gewebe auf die Nervenwurzeln von Schweinen nachweisen. Ein positiver Effekt der NSAID auf die nervale Funktion ist offensichtlich durch die allgemein entzündungshemmende Wirkung der Medikamente zu erklären. Ein endoneural antiödematöser Effekt ist wahrscheinlich.

Die lokale paravertebrale Infiltrationsanästhesie wie auch die intrathekale Applikation von *Lokalanästhetika* haben einen bisher pathogenetisch nicht geklärten, über die Wirkungsdauer des Medikamentes *hinausgehenden* schmerzlindernden Effekt. Yabuki et al. [278] haben festgestellt, daß die direkt im Anschluß an eine experimentelle Applikation von Bandscheibengewebe durchgeführte Umflutung der Nucleus pulposus-exponierten Nervenwurzel mit Lidocain einen hemmenden Effekt auf die Ausbildung der epiduralen Entzündungsreaktion hat und die Nervenleitgeschwindigkeit bei den mit Lidocain

behandelten Nerven weniger stark abfällt. Eine hypothetische Interpretation dieser Untersuchungsergebnisse wäre die lokalanästhetische Unterbrechung der nozizeptiv ausgelösten neurogenen Entzündungsmechanismen duraler Gefäße, womit die verminderte epidurale Entzündung erklärt würde. Auch die Hyperexzitabilität der Hinterhornneuronen (durch Substanz P ausgelöste zentrale Sensibilisierung) könnte durch die Wirkung eines Lokalanästhetikums vermindert worden sein. Hierdurch wären Hyperalgesie und Schmerzausbreitung in ihrem Ausmaß eingeschränkt.

Im Ergebnis der vorliegenden Studien blieben die AChE- und BChE-Aktivität und auch der Albuminquotient nach intrathekaler Bupivacainapplikation *ohne* folgenden operativen Eingriff unverändert. *Ein Effekt des Lokalanästhetikums auf die neuronalen Sekretionsmechanismen bzw. die Blut-Liquor-Schrankenfunktion ließ sich somit liquoranalytisch nicht nachweisen.* Dieser Befund an experimentell zugänglichem *humanem* Untersuchungsmaterial relativiert die im Abschnitt 7.3 beschriebenen, hauptsächlich in Tierversuchen beobachteten schädigenden Begleitwirkungen von Bupivacain auf verschiedene Gewebe. Letztere sind wahrscheinlich bei kurzzeitiger Anwendung des Anästhetikums am Menschen nicht zu erwarten. Die nach *operativen* Eingriffen unter Spinalanästhesie beobachtete Erniedrigung der AChE- und BChE-Aktivität im Liquor, sowie die Erniedrigung der BChE-Aktivität und der Albuminkonzentration im Serum kann somit nicht auf die Wirkung von Bupivacain zurückgeführt werden. Es handelt sich offensichtlich um anderweitig im Rahmen des chirurgischen Eingriffes ausgelöste Mechanismen. Die im Untersuchungszeitraum bis 48 Stunden gleichbleibenden Albumin-, aber zunehmenden BChE-Quotienten Liquor/Serum finden eine Erklärung in der schrankenfunktionsbedingten (hier vornehmlich der Liquorresorptionsanteil) Einstellung des Liquor-Serum-Gleichgewichtes. Während diese Einstellung für Albumin im beobachteten Zeitraum im Wesentlichen gegeben war, scheint sie für das bedeutend höher-molekulare BChE-Molekül noch nicht vollzogen.

Die vorgestellten Untersuchungsergebnisse zeigen erstmalig anhand von Analysen *humaner* Liquorproben, daß die alleinige Applikation von Bupivacain als Infiltrations- und als intrathekales Anästhetikum keine signifikanten Schädigungen der neuronalen Gewebe bzw. der Blut-Liquor-Schrankenfunktion

hervorruft. Die therapeutische Anwendung des Pharmakons kann aus dieser Sicht als sicher angesehen werden.

9. Zusammenfassung der gesamten Arbeit

Aus ätiologischer Sicht sind Krankheitsbilder, welche mit degenerativen Veränderungen der lumbalen Wirbelsäule einhergehen, durch Alteration der nervalen und meningealen Strukturen begründet. Lokaler, sowie fortgeleiteter lumbaler Schmerz, Lumboischialgie, Wurzelreizsymptomatik und neurologisches Defizit assoziiert mit Bandscheibenvorfällen, Fasettengelenkarthrose oder engem knöchernen Spinalkanal prägen die Symptomatik. Eine umfassende Erklärung der Pathogenese dieser klinischen Erscheinungsbilder auf geweblicher und zellulärer Ebene konnte bisher nicht gefunden werden. Die Erkenntnisse aktueller neurochemischer und neuromorphologischer Studien eröffnen die Möglichkeit eines analytischen Untersuchungsansatzes über den Liquor cerebrospinalis.

Das *Ziel* der vorliegenden Studien war die Analyse der Cholinesterasen AChE und BChE, des Albumins und Gesamteiweißes in Liquor und Serum bei durch degenerative Veränderungen der Lendenwirbelsäule verursachter Alteration neuraler und meningealer Strukturen. Aus den Untersuchungsergebnissen sollten Informationen zur Pathogenese von Schmerz und Funktionsminderung bei degenerativen lumbalen Wirbelsäulenschäden gewonnen werden.

Normale Liquor- und Serumproben von klinisch gesunden Personen wurden als Kontrollen herangezogen. Entsprechend der spezifischen Fragestellungen wurden orthopädische und neurochirurgische Patienten untersucht. Ein Inhibitor-freier Test zur parallelen Bestimmung von AChE- und BChE-Aktivitäten im Liquor wurde entwickelt.

Acetylcholinesteraseaktivität im lumbalen und ventrikulären Liquor: Die Analyse von normalen Liquorproben ergab einen Referenzbereich der AChE-Aktivitäten im lumbalen Liquor von 9,2 bis 24,4 nmol/min x ml. Die Mehrzahl der in ventrikulären Liquorproben neurochirurgischer Patienten ermittelten AChE-Aktivitäten lag in einem Bereich bis 4 nmol/min x ml. Unter physiologischen Bedingungen ist ein ventriculo-lumbaler AChE-Aktivitätsgradient von ca. 1 : 3 anzunehmen.

Butyrylcholinesteraseaktivität im lumbalen und ventrikulären Liquor: Der ermittelte Referenzbereich der BChE-Aktivität im lumbalen Liquor lag zwischen 5,4 und 17,0 nmol/min x ml. Die Mehrzahl der ventrikulären Liquorproben des neurochirurgischen Patientengutes zeigte BChE-Aktivitäten bis 6 nmol/min x ml. Im Mittel aller untersuchten ventrikulären Liquorproben überwog die Ultrafiltration des Enzyms durch die Blut-Liquor-Schranke gegenüber der zellulären Sekretion aus dem Nervensystem. Ein ventriculo-lumbaler BChE-Aktivitätsgradient von ca. 1 : 2 ist unter normalen Bedingungen zu erwarten.

Cholinesteraseaktivitäten und Blut-Liquor-Schrankenfunktion im lumbalen Liquor bei degenerativen Veränderungen der Lendenwirbelsäule: Die AChE-Aktivität war bei Patienten mit neurologischen Defiziten signifikant gesteigert. Magnetresonanztomographisch diagnostizierte laterale Engpässe führten zu einer signifikanten Erhöhung der AChE-Aktivität. Mediale Engpässe bedingten eine Erhöhung der AChE-Aktivität, jedoch war diese nicht signifikant. Signifikante Erhöhungen der BChE-Aktivität, der Gesamteiweißkonzentration im Liquor bzw. des Liquor/Serum-Albuminquotienten fanden sich bei Patienten mit symptomatischen degenerativen Schäden der Lendenwirbelsäule unabhängig vom neurologischen Status bzw. von der Lokalisation des Engpasses. Hinsichtlich der Erhöhung aller untersuchten Liquorparameter waren keine signifikanten Unterschiede zwischen akuten und chronischen Krankheitsbildern festzustellen.

Einfluß von Bupivacain auf Cholinesteraseaktivitäten, Gesamtprotein und Albuminquotient im lumbalen Liquor und Serum: Signifikante Korrelationen zwischen Bupivacaindosierungen und Parameterveränderungen bestanden nicht. Erniedrigte AChE-Aktivitäten im Liquor wurden bei unter spinaler Bupivacainanästhesie operierten Patienten beobachtet. Nach intrathekalen Bupivacaingaben ohne nachfolgende Operation blieb die AChE-Aktivität des Liquors unverändert. Operative Eingriffe unter spinaler Anästhesie mit Bupivacain induzierten signifikant erniedrigte Serum- und Liquoraktivitäten der BChE, während Spinalanästhesie mit Bupivacain ohne Operation keine derartigen Veränderungen hervorrief. Die Serum-BChE-Aktivität blieb nach periartikulären Infiltrationen der lumbosakralen Wirbelgelenke unbeeinflusst. Operative Eingriffe unter Allgemeinnarkose verursachten eine erniedrigte Serum-BChE-Aktivität. Der Albuminquotient Liquor/Serum war nach intrathekalen Gaben von Bupivacain generell unverändert.

Schlußfolgerungen. Schmerzhaft degenerative Lendenwirbelsäulenschäden bedingen eine gesteigerte AChE-Sekretion in den Liquor, welche als Zeichen funktioneller Stimulation vitaler neuronaler Zellen der Nervenwurzeln zu werten ist. Die neuronale Aktivierung wird durch mechanische und dem degenerierten Bandscheibengewebe entstammende chemische Noxen ausgelöst. Ein zusätzlicher endoneuraler Entzündungsmechanismus ist anzunehmen. Weiterhin ist ein Zusammenhang der erhöhten AChE-Sekretion mit Substanz P im Sinne der Hydrolyse dieses schmerzassoziiert freigesetzten Mediators denkbar. Die erhöhte neuronale AChE-Sekretion steht offensichtlich nicht mit der Funktion des Enzyms in cholinergen Transmissionssystemen in Verbindung.

Die BChE-Aktivität des lumbalen Liquors wird normalerweise hauptsächlich von der neuronalen Sekretion bestimmt, unter pathologischen Bedingungen findet sich ein verstärkter Einstrom aus dem Blut. Die Erhöhung der BChE-Aktivität im Liquor bei degenerativen Lendenwirbelsäulenschäden kann als Indiz sowohl für die Aktivierung neuronaler sekretorischer Aktivität, als auch für einen lokalen Defekt der Blut-Liquor-Schrankenfunktion gewertet werden. Erhöhte Liquor/Serum-Albuminquotienten und Gesamteiweißkonzentrationen im Liquor bestätigten die Schrankenfunktionsstörung, welche wahrscheinlich durch neurogene Entzündung duraler Gefäße und/oder direkte endoneurale vaskuläre Permeabilitätssteigerung nach Zustrom von Entzündungsmediatoren aus epiduralen Gefäßen ausgelöst wird.

Erniedrigte Cholinesteraseaktivitäten, Albuminquotienten und Gesamteiweißkonzentrationen nach operativer Intervention sind nicht auf die Wirkung des parallel applizierten Medikamentes Bupivacain zurückzuführen. Intrathekale Bupivacainapplikation bewirkt keine Änderung der neuronalen sekretorischen Aktivität bzw. der Funktion der Blut-Liquor-Schranke. Eine hypothetische Erklärung für den über die Wirkungsdauer von Lokalanästhetika hinausgehenden schmerzlindernden Effekt ist die Unterbrechung nozizeptiv ausgelöster neurogener Entzündungsmechanismen duraler Gefäße. Auch die zentrale Sensibilisierung der Hinterhornneuronen könnte durch das Lokalanästhetikum vermindert sein.

Anhang 1

Ableitung der Berechnungsformel zum Inhibitor-freien Test und Untersuchungen zur Verifizierung des Testverfahrens

Ableitung der Berechnungsformel

Das BChE-Aktivitätsverhältnis $QBChE_{SE}$ im verdünntem Serum berechnet sich aus dem Quotienten der Extinktionsdifferenzen bezogen auf die Substrate ACh und BCh:

$$QBChE_{SE} = \Delta E_{ACh_{SE}} / \Delta E_{BCh_{SE}} \quad (\text{Gleichung 1}).$$

Das BChE-Aktivitätsverhältnis $QBChE$ ist in Liquor und Serum bei einem Probanden identisch (5 mmol/l Endkonzentration an ACh und BCh):

$$QBChE_{SE} = QBChE_{CSF} \quad (\text{Gleichung 2}).$$

Da die Extinktionsdifferenzen, welche im Liquor gegenüber ACh gemessen werden, der Summe der Aktivitäten der AChE und der BChE gegenüber diesem Substrat entsprechen,

$$\Delta E_{ACh_{CSF}} = \Delta E_{BChE}^{ACh}_{CSF} + \Delta E_{AChE}^{ACh}_{CSF} \quad (\text{Gleichung 3})$$

läßt sich die Extinktionsdifferenz, die auf die BChE-Aktivität zurückzuführen ist, wie folgt berechnen (Gleichung 2 und 3):

$$\Delta E_{BChE}^{ACh}_{CSF} = \Delta E_{ACh_{CSF}} - \Delta E_{AChE}^{ACh}_{CSF} = QBChE_{SE} \times \Delta E_{BChE}^{BCh}_{CSF} \quad (\text{Gleichung 4}).$$

Die auf der AChE-Aktivität basierende Extinktionsdifferenz kann aus Gleichung 4 isoliert werden:

$$\Delta E_{AChE}^{ACh}_{CSF} = \Delta E_{ACh_{CSF}} - QBChE_{SE} \times \Delta E_{BChE}^{BCh}_{CSF} \quad (\text{Gleichung 5}).$$

Die AChE-Aktivität läßt sich durch Multiplikation mit dem Faktor F (siehe Enzymtests) errechnen:

$$AChE_{CSF} = [\Delta E_{ACh_{CSF}} - QBChE_{SE} \times \Delta E_{BChE}^{BCh}_{CSF}] \times F \quad (F = 65)$$

Da $\Delta E_{BChE}^{BCh}_{CSF}$ der totalen im Liquor gemessenen Extinktionsdifferenz (basierend auf der BChE-Aktivität) gegenüber BCh (ΔE_{BCh}_{CSF}) entspricht, läßt sich die Berechnungsformel vereinfacht darstellen:

$$AChE_{CSF} = [\Delta E_{ACh}_{CSF} - Q_{BChE_{SE}} \times \Delta E_{BCh}_{CSF}] \times F \quad (F = 65)$$

Untersuchungen zur Verifizierung des Testverfahrens

Für die Untersuchungen wurden humane lumbale Liquorproben verwendet. Um das individuelle Aktivitätsverhältnis der BChE gegenüber den Substraten ACh und BCh zu bestimmen, nutzten wir Serumproben der gleichen Person. Ausreichende Serum- bzw. Liquorvolumina für experimentelle Zwecke wurden durch Mischung identischer Mengen aus Proben von drei bis vier Probanden erzielt.

Die Berechnung der AChE-Aktivität des Liquors mit dem Inhibitor-freien Test (Test I) und die Beschreibung der Testmethode sind dem Kapitel 3.1.1 zu entnehmen. Vergleichende Analysen der AChE-Aktivität im Liquor wurden mit Untersuchungsverfahren durchgeführt, die entweder den weitgehend selektiven AChE-Inhibitor BW284c51 (1,5-bis(4-Allyldimethylammoniumphenyl) pentan-3-eins Dibromid) oder den ebenfalls weitgehend selektiven BChE-Inhibitor isoOMPA (Tetraisopropylpyrophosphoramid) einsetzen. BW284c51 wird im folgenden Text als anti-AChE, und isoOMPA als anti-BChE bezeichnet.

Endkonzentrationen von 5 $\mu\text{mol/l}$ anti-AChE (Test II) und von 0,5 - 5 mmol/l anti-BChE (Test III) wurden für die Inhibitortests eingesetzt.

Berechnungsformeln für $AChE_{CSF}$ bei Verwendung der Inhibitortests:

AChE-Aktivität des Liquors gegenüber dem Substrat ACh mit Inhibitor anti-AChE (Test II):

$$AChE_{CSF} = [\Delta E_{ACh}_{CSF} - \Delta E_{BChE(anti-AChE)}^{ACh}_{CSF}] \times F \quad (F = 65)$$

AChE-Aktivität des Liquors gegenüber dem Substrat ACh mit Inhibitor anti-BChE (Test III):

$$AChE_{CSF} = \Delta E_{AChE(anti-BChE)}^{ACh}_{CSF} \times F \quad (F = 65)$$

Zeit- und Substratkinetik

Bei nachfolgend dargestellten Substratsättigungen von je 5 mmol/l waren die Zeitverläufe sowohl der AChE als auch der BChE über mindestens 20 Minuten linear. Diese Zeit wurde daher als generelle Reaktionszeit bei den Aktivitätsbestimmungen verwendet.

Zur grundsätzlichen Überprüfung der Durchführbarkeit des Inhibitor-freien Verfahrens mußten folgende drei Voraussetzungen erfüllt sein:

Voraussetzung a): Die Aktivitäten der BChE gegenüber den Substraten ACh und BCh müssen unbeeinflussbar durch den AChE-Inhibitor anti-AChE sein, da ansonsten die Identität der QBChE_{SE} und der QBChE_{CSF} nicht ermittelt werden kann. Dazu wurden gereinigte BChE, BChE des Serums und die Summe beider Quellen in Gegenwart und Abwesenheit von anti-AChE getestet. Nach Tabelle A1.1 ist der Inhibitor ohne Einfluß, so daß sich ungehemmte und anti-AChE beeinflusste BChE-Quotienten nicht signifikant voneinander unterscheiden (T-Test; gepaarte Stichproben).

Voraussetzung b): Unter Nutzung der Erkenntnisse in Voraussetzung a) müssen die Substratsättigungsbedingungen erarbeitet werden, die eine Identität von QBChE_{SE} und QBChE_{CSF} beweisen. Nur dann wäre das Inhibitor-freie Verfahren durchführbar. Dazu wurden die Substratkinetiken der AChE (in Gegenwart und Abwesenheit von anti-AChE gemäß Methode II) und der BChE (Inhibitor-frei nach Methode I) in gepoolten Liquores (Abbildung A1.1), sowie von BChE in den zugehörigen, im gleichen Verhältnis gepoolten Sera aufgenommen (Abbildung A1.2). Die aus den Kinetiken in Liquores und Sera berechneten QBChE sind in Abbildung A1.3 in Abhängigkeit von den Substratendkonzentrationen dargestellt.

Wie in Abbildung A1.1 ersichtlich, war die Substratsättigung der AChE im Liquor bereits bei einer Endkonzentration von 2 mmol/l ACh erreicht. Die BChE beider Körperflüssigkeiten zeigte keine klassischen Sättigungskinetiken gegenüber den beiden Substraten. Die Kurven verlaufen jedoch ab 3 mmol/l Substratkonzentration sowohl im Liquor, als auch im korrespondierenden Serum nahezu parallel (Abbildungen A1.1 und A1.2). Die BChE-Quotienten gegenüber beiden Substraten waren bei 5 mmol/l Substrateinsatz zwischen Liquor und Serum tatsächlich nahezu identisch (Abbildung A1.3).

Tabelle A1.1. Effekt von anti-AChE (5 mmol/l Endkonzentration; siehe Voraussetzung b) auf das Aktivitätsverhältnis QBChE (ACh/BCh). BChE wurde als gereinigtes Enzym (mit und ohne Serumzusatz) und als Serumenzym getestet. Mittelwerte QBChE (ACh/BCh) \pm SD, Mittelwert der individuellen Differenzen \pm SEM, Minimum - Maximum.

Enzym	MW QBChE \pm SD (Minimum - Maximum)		MW der individuellen Differenzen \pm SEM
	nicht gehemmt	anti-AChE gehemmt	
gereinigte BChE (n = 8)	0,48 \pm 0,02 (0,45 – 0,51)	0,48 \pm 0,02 (0,45 – 0,51)	0,005 \pm 0,003 n.s.
BChE des Serums (n = 22)	0,54 \pm 0,02 (0,50 – 0,57)	0,53 \pm 0,03 (0,47 – 0,57)	0,011 \pm 0,011 n.s.
gereinigte BChE mit Serum (n = 22)	0,55 \pm 0,03 (0,51 – 0,57)	0,54 \pm 0,02 (0,49 – 0,56)	0,014 \pm 0,010 n.s.

Abbildung A1.1. Substratkinetik der AChE- und BChE-Aktivität im Liquor: AChE gegenüber ACh nach Inhibitor-Testmethode II; BChE gegenüber den Substraten ACh und BCh ebenfalls nach Inhibitor-Testmethode II. Liquor-Pool von 20 Probanden.

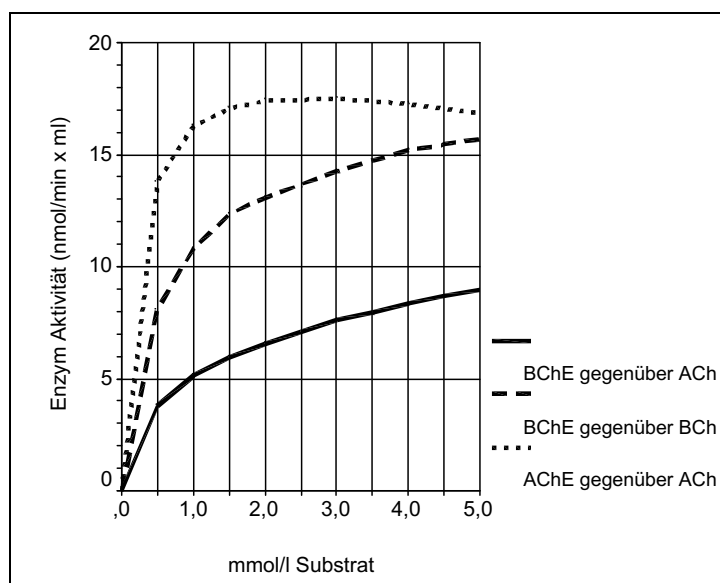


Abbildung A1.2. Substratkinetik der BChE gegenüber den Substraten ACh und BCh im korrespondierenden gepoolten Serum entsprechend der Testmethode I (gleiche Probanden wie in Abbildung A1.1).

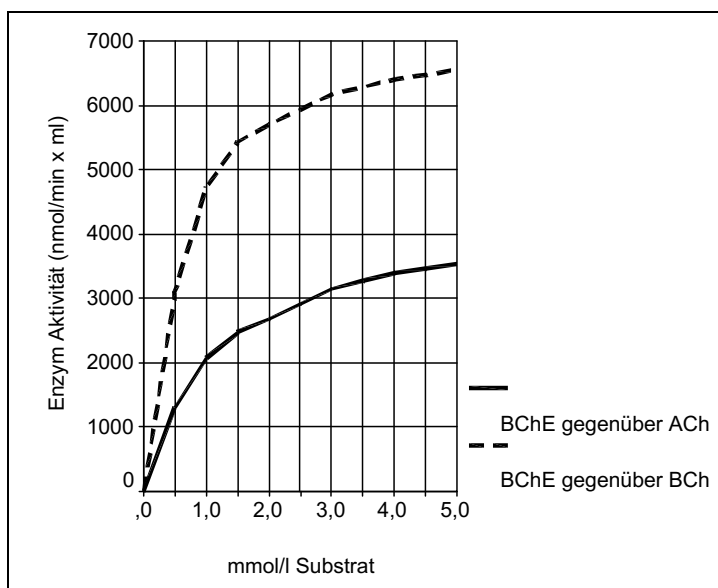
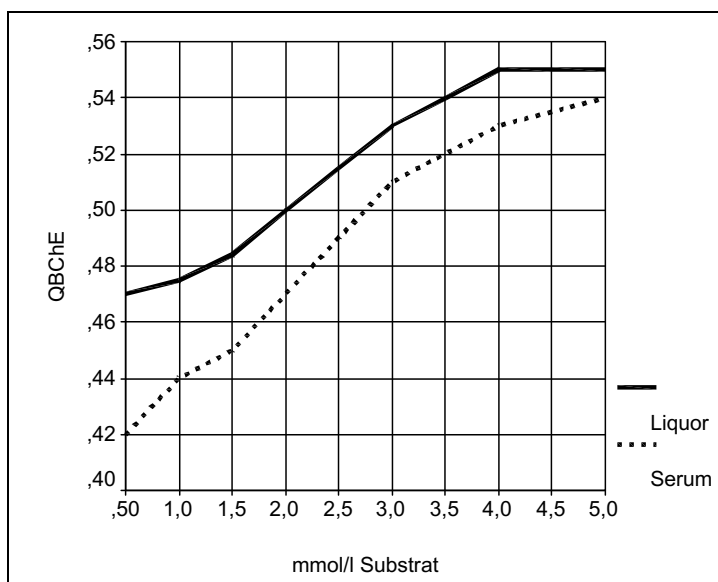


Abbildung A1.3. BChE-Aktivitätsquotienten (QBChE_{CSF} und QBChE_{SE}) gegenüber den Substraten ACh und BCh in Liquor und Serum (berechnet aus den Daten, die in Abbildung A1.1 und A1.2 dargestellt wurden).



Um letzteren Befund zu bestätigen, wurden die QBChE von 25 gemischten korrespondierenden Liquor- und Serumproben in einer zusätzlichen Testserie analysiert. Dabei enthielt jede Mischprobe entsprechende Liquores und Sera von 5

mal 4 und einmal 5 Probanden. Tabelle A1.2 veranschaulicht das Ergebnis. Die Unterschiede zwischen QBChE_{CSF} und QBChE_{SE} waren auch hier nicht signifikant (T-Test; gepaarte Stichproben), sobald die Substratendkonzentration mindestens 4 mmol/l betrug. Um das Testsystem zu standardisieren, wurde daher generell eine Substratendkonzentration von 5 mmol/l gewählt.

Tabelle A1.2. QBChE (ACh/BCh) im Liquor (mit Inhibitor anti-AChE) und im korrespondierenden Serum (ohne Inhibitor). Die Proben entstammten 25 Mischliquores und den dazu korrespondierenden Mischsera, wobei jedes einzelne Gemisch Liquor- bzw. Serumproben von 4 bzw. 5 Probanden enthielt. Dargestellt sind Mittelwerte QBChE (ACh/BCh) \pm SD, Mittelwert der individuellen Differenzen \pm SEM, Minimum - Maximum.

QBChE _{CSF}	QBChE _{SE}	MW der individuellen Differenzen \pm SEM (Minimum - Maximum)
0,56 \pm 0,02	0,55 \pm 0,01	0,005 \pm 0,003
(0,52 – 0,57)	(0,52 – 0,56)	(-0,02 – 0,03) n.s.

Mit den Ergebnissen von Abbildung A1.1 - A1.3 und Tabelle A1.2 wurden die Identität von QBChE_{CSF} und QBChE_{SE} bestätigt und mit den Substratendkonzentrationen von 5 mmol/l die experimentellen Voraussetzungen der Durchführbarkeit des Inhibitor-freien Tests gegeben.

Voraussetzung c): Vorangehende Untersuchungen mit kommerzieller gereinigter BChE ließen eine Abhängigkeit des Quotienten QBChE von der Proteinkonzentration vermuten. Um diese Abhängigkeit bei im Meßbereich der BChE von Liquores und Sera auftretenden Proteinkonzentrationen zu testen, wurden letztere zwischen 100 und 750 mg/l zu gereinigter BChE zugesetzt und damit die Situationen in ventrikulären und lumbalen Liquores, sowie in verdünnten Sera simuliert.

Wie in Tabelle A1.3 ersichtlich, nahm das Aktivitätsverhältnis gereinigter BChE unter Zusatz von Albumin leicht zu; unter Zusatz von gemischten Serumproteinen ergab sich jedoch ein beträchtlicher Anstieg. Der stimulierende Effekt auf die Hydrolyse ist offensichtlich für ACh größer als für BCh. Es ließ sich jedoch feststellen, daß bereits bei einer Proteinkonzentration von 100 mg/l die beschriebene Aktivierung maximal ist und konstant bleibt, so daß ein

entscheidender Einfluß wechselnder Proteinkonzentrationen auf das Testsystem im Rahmen des Meßbereiches ausgeschlossen werden konnte.

Die bis hierhin erläuterten Untersuchungen waren entscheidende Voraussetzungen [a), b) und c)] für die Ableitung der Berechnungsformeln im Inhibitor-freien Testsystem für die AChE-Aktivität im Liquor und für die Analyse der BChE-Aktivität in Liquor und Serum.

Tabelle A1.3. QBChE (ACh/BCh): Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (n: Anzahl der getesteten Proben) im Reaktionsmedium. BChE wurde als gereinigtes Enzym, als gereinigtes Enzym mit Albumin gemischt, als Enzym aus verdünnten humanen Sera und als gereinigtes Enzym gemischt mit BChE aus verdünnten Sera getestet. Mittelwerte QBChE \pm SD.

Enzymquelle	Proteinkonzentration		MW QBChE \pm SD
gereinigte BChE	-	(n = 21)	0,48 \pm 0,02
gereinigte BChE mit Albumin	< 100 mg/l	(n = 15)	0,48 \pm 0,02
	> 100 mg/l	(n = 27)	0,51 \pm 0,02
BChE aus verdünnten Sera	100 – 750 mg/l (n = 7)		0,56 \pm 0,02
gereinigte BChE gemischt mit BChE aus verdünnten Sera	100 – 750 mg/l (n = 7)		0,55 \pm 0,03

Vergleich des Inhibitor-freien Tests mit Methoden, welche anti-AChE oder anti-BChE nutzen

Um die Zuverlässigkeit des Inhibitor-freien Tests (Test I) im Vergleich zu Methoden unter Nutzung von anti-AChE (Test II) oder anti-BChE (Test III) zu analysieren, wurden 25 gemischte Liquorproben parallel mit allen drei Verfahren getestet. Die Aktivitäten für AChE lagen zwischen 3 und 27 nmol/min x ml, für BChE zwischen 8 und 22 nmol/min x ml. Zur weiteren Differenzierung wurden die gemessenen Daten in Gruppen unterteilt. Die Ergebnisse (Tabelle A1.4) sind als prozentuale Abweichungen von der Aktivitätsbestimmung mit dem Inhibitor-freien Test berechnet.

Nach Tabelle A1.4 waren die prozentualen Differenzen zwischen dem Inhibitor-freien Test (I) und der anti-AChE-Methode (II) für die AChE und die BChE-Aktivitäten nicht signifikant (T-Test; gepaarte Stichproben). Die Abweichungen, welche sich zwischen den Untergruppen ergaben, waren für beide Methoden nahezu identisch.

Beim Vergleich zwischen dem Inhibitor-freien Testverfahren (I) und der anti-BChE-Methode (III) ergaben sich jedoch ca. 8% niedrigere AChE-Aktivitäten und ca. 5 % niedrigere BChE-Aktivitäten. Diese Unterschiede waren signifikant (T-Test; gepaarte Stichproben) und ausgeprägter in den Untergruppen mit niedrigeren Aktivitäten. Der Nachteil der anti-BChE-Methode wurde bereits in einer vorangegangenen Pilotstudie sichtbar: während gereinigte BChE bereits bei 0,5 mmol/l Endkonzentration von anti-BChE komplett gehemmt wurde, zeigte das Serumenzym selbst bei 5 mmol/l Endkonzentration des Hemmstoffes noch eine Restaktivität. Die vorliegenden Daten bestätigen ebenfalls, daß eine Konzentration von über 1 mmol/l anti-BChE die AChE hemmt.

Tabelle A1.4. Testmethoden I – III wurden zur Analyse der AChE- und BChE-Aktivitäten im Liquor verwendet. Prozentuale Abweichungen der gemessenen Aktivitäten zwischen der Inhibitor-freien Methode (Testmethode I; Aktivität = 100%) und den Testmethoden mit anti-AChE (Testmethode II) bzw. mit anti-BChE (Testmethode III). Die Proben entstammten 25 Mischliquores und den dazu korrespondierenden Mischsera.

Aktivität gemessen mit Testmethode I: gesamte und partielle Meßbereiche (nmol/min x ml)		Prozentuale Abweichungen von Testmethode I (100%) gegenüber	
		Testmethode II (prozentualer MW ± SEM)	Testmethode III (prozentualer MW ± SEM)
	3,0 – 27,0 (gesamt n = 25)	- 1,0 ± 0,51 n.s.	- 8,5 ± 1,43 (p < 0,001)
AChE	3,0 – 15,0 (n = 8)	- 1,6 ± 1,45 n.s.	- 10,3 ± 2,54 (p < 0,01)
	15,1 – 27,0 (n = 17)	- 0,7 ± 0,36 n.s.	- 6,9 ± 1,83 (p < 0,001)
	8,0 – 22,0 (gesamt n = 25)	1,2 ± 0,81 n.s.	- 4,9 ± 0,91 (p < 0,001)
BChE	8,0 – 15,0 (n = 13)	1,3 ± 1,15 n.s.	- 6,1 ± 1,31 (p < 0,001)
	15,1 – 22,0 (n = 12)	1,2 ± 0,87 n.s.	- 3,6 ± 1,18 (p < 0,01)

Diskussion

Bei der Beurteilung widersprüchlicher Ergebnisse bezüglich einer Veränderung der Liquoraktivität der AChE bei neuropsychiatrischen Krankheitsbildern erwähnten Davis und Goodnick [69] unter anderem die Problematik anzuzweifelnder analytischer Vorgehensweisen. Diese Wertung trifft unserer Meinung nach nicht nur auf die AChE-, sondern auch auf die BChE-Aktivitätsbestimmung zu.

Bei gleichzeitigem Auftreten von AChE und BChE in Körperflüssigkeiten und Geweben orientierten bisherige Bestimmungsmethoden auf die Verwendung von spezifischen Hemmstoffen (anti-AChE und/oder anti-BChE), um die Aktivitäten beider Cholinesterasen im Test voneinander trennen zu können. Der Grund für dieses Vorgehen liegt in der überlappenden Substratspezifität beider Enzyme gegenüber ACh: AChE hydrolysiert als spezifische Acetylcholin-acetylhydrolase nur ACh, während BChE als unspezifische Acylcholin-acylhydrolase mit ACh und BCh, sowie mit Benzoylcholin und Aryl- und Alkylestern reagiert [251].

Nicht nur die Vielzahl von Substraten der BChE, sondern auch die Verwendung ihrer unterschiedlichen Testendkonzentration sind Gründe für die eingeschränkte Vergleichbarkeit von Literaturergebnissen. Wegen der nicht erreichbaren Sättigungskinetik des Enzyms (Abbildung A1.1) bewirken uneinheitliche Testendkonzentrationen der Substrate zusätzliche Verwirrungen.

Bezüglich des Einsatzes der genannten Inhibitoren wäre eigentlich die Nutzung von anti-AChE ausreichend, wenn man die BChE-Aktivität nur nach ihrer Hydrolyserate mit BCh berechnen würde. Die AChE-Aktivität entspräche dann der Differenz zwischen der ungehemmten und der gehemmten Hydrolyserate mit dem Substrat ACh (entsprechend der oben beschriebenen Testmethode II).

Andererseits wäre auch die alleinige Nutzung des Hemmstoffes anti-BChE ausreichend, da die direkt gemessene Hydrolyserate mit dem Substrat ACh der AChE-Aktivität entspräche (entsprechend der oben beschriebenen Testmethode III). Es wird jedoch bei Betrachtung der Daten in Tabelle A1.4 sichtbar, daß die so bestimmten Aktivitäten entscheidend von denen der anti-AChE-Methode (Test II) abweichen. Diese Diskrepanz wird durch den oft inkompletten Hemmeffekt von anti-BChE gegenüber BChE selbst bei millimolaren BCh-Endkonzentrationen

hervorgerufen. Zusätzlich kann anti-BChE auch die AChE hemmen. Die Methode nach Test III ist deshalb als unpräzise anzusehen.

Zur Standardisierung der Testbedingungen bei der Inhibitor-freie Methode erschien eine Substratkonzentration von 5 mmol/l ausreichend sicher (Abbildung A1.1), obwohl damit für die BChE noch keine vollständige, aber ausreichende Substratsättigung erreichbar wurde.

Nach der ermittelten Formel erfordert die Inhibitor-freie Methode nur die Messung der Hydrolyseraten von Serum und Liquor gegenüber den Substraten ACh und BCh. Diese sind innerhalb der Testbedingungen nicht von den Proteinkonzentrationen des verdünnten Serums oder des Liquors abhängig.

Wie in Tabelle A1.4 ersichtlich, stimmen die Ergebnisse der Inhibitor-freien Methodik (Test I) weitgehend mit denen des anti-AChE nutzenden Verfahrens (Test II) überein. Die Abweichungen lagen nicht über 2%. Beide Methoden sind verlässlich. Der Inhibitor-freie Test erfordert minimalen materiellen Aufwand und kann in jedem Routinelabor durchgeführt werden.

Anhang 2

Die AChE-Bestimmung im Liquor cerebrospinalis mit Bupivacain als BChE-Inhibitor [135]

Das Lokalanästhetikum Bupivacain erwies sich *in vitro* als relativ spezifischer Inhibitor hinsichtlich seiner unterschiedlichen Wirkung auf die AChE- und die BChE-Aktivität. Die Verwendung des Medikamentes als BChE-Hemmstoff innerhalb eines AChE-Testverfahrens erschien damit naheliegend. Es war das Ziel dieser Studie, auf dieser Grundlage einen quantitativen Labortest zu entwickeln.

In vitro Untersuchungen mit gereinigten Cholinesterasen wurden durchgeführt, um diejenige Bupivacainkonzentration zu bestimmen, welche eine maximale BChE- und gleichzeitig minimale AChE-Hemmung hervorruft. Formeln zur Berechnung der AChE-Aktivität unter Nutzung spektrophotometrisch in Proben mit und ohne Bupivacain ermittelter Extinktionsdifferenzen im Ellman-Test [80] wurden abgeleitet. Die Gültigkeit der Formeln wurde an Gemischen aus gereinigten Cholinesterasen und an humanen Liquorproben im vergleichenden Test mit dem Inhibitor-freien Verfahren nachgewiesen.

Material und Methoden

Bupivacain-Hemmtest

Die spektrophotometrische Methode von Ellman et al. [80] diente als grundlegendes Analyseverfahren. 0,1 ml gereinigte Cholinesteraselösung (AChE und BChE in Ringerlösung) bzw. 0,1 ml zellfreier humaner Liquor als Quelle der Cholinesterasen wurden bei der Erarbeitung des Bupivacain-Hemmtests eingesetzt. Das Substrat Acetylthiocholinjodid wurde in einer Endkonzentration von 1 mmol/l verwendet. Die Endkonzentration von DTNB betrug 1 mmol/l. Bei 37°C (gesamtes Testvolumen: 1,3 ml) wurde die lineare Reaktion nach 20 min mit 0,5 ml einer 0,1-millimolaren Eserinsalizylsäure gestoppt. Die enzymatisch abgespaltene 5-Thio-2-nitrobenzoesäure wurde bei 412 nm gemessen. Die Enzymaktivitäten errechneten sich durch Multiplikation der Extinktionsdifferenz

(ΔE) mit dem Faktor 65. Dieser Faktor resultiert aus den Volumina der reagierenden Substanzen, dem Endvolumen von 1,8 ml, der Reaktionszeit von 20 min und dem millimolaren Extinktionskoeffizienten von 13,88.

Die analytischen Testansätze wurden bei der Beschreibung des *Inhibitor-freien Tests* ausführlich im Abschnitt 3.1.1 dargestellt.

Testsubstanzen sind Abschnitt 3.1.4 zu entnehmen

Testserien mit gereinigten Enzymen

Testserien mit Gemischen gereinigter Cholinesterasen:

60 Proben (mittlere AChE-Aktivität: $43,5 \pm 1,3$ nmol/min x ml; 35,8 - 56,5 nmol/min x ml) getestet mit 0,1 mmol/l Bupivacain

85 Proben (mittlere AChE-Aktivität: $49,8 \pm 2,7$ nmol/min x ml; 25,6 - 64,5 nmol/min x ml) getestet mit 0,2 mmol/l Bupivacain

24 Proben (mittlere AChE-Aktivität: $51,2 \pm 6,2$ nmol/min x ml; 29,7 - 71,2 nmol/min x ml) getestet mit 0,5 mmol/l Bupivacain

Tests mit humanen Liquorproben

Humane Liquorproben, welche nach abgeschlossenen Routineuntersuchungen zur Verfügung standen, wurden in einer vergleichenden Testserie zur Gegenüberstellung von Bupivacain-Hemmtest und Inhibitor-freiem Test verwendet.

Versuchsreihen:

45 Liquorproben getestet mit 0,1 mmol/l Bupivacain

45 Liquorproben getestet mit 0,2 mmol/l Bupivacain

8 Liquorproben getestet mit 0,5 mmol/l Bupivacain

Statistik

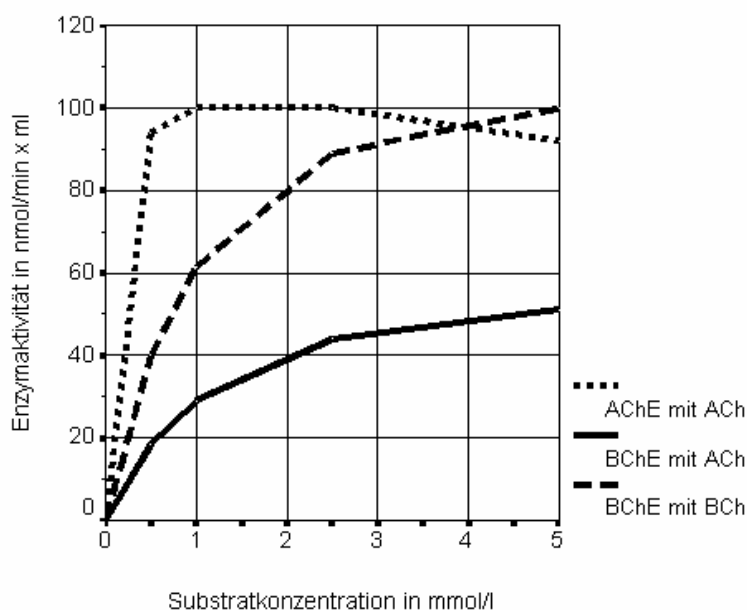
Alle in Gruppen ausgewerteten Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Die Differenzen der Mittelwerte wurden mit nicht parametrischen Verfahren analysiert (Mann-Whitney-Test für unabhängige Datengruppen und Wilcoxon-Test für abhängige Datengruppen). Signifikanzniveau 0,05.

Ergebnisse

AChE hydrolysierte ACh mit maximaler Aktivität bei einer Substratkonzentration von 1 mmol/l. Diese Substratkonzentration wurde deshalb für alle Untersuchungen genutzt. BChE zeigte dagegen nur etwa ein Viertel seiner maximalen Aktivität bei einer Substratkonzentration von 1 mmol/l (Abbildung A2.1).

Anmerkung: Die Substratkinetiken in Abb. A1.1 (Anhang 1) und in Abb. A2.1 zeigen prinzipiell identische Verläufe. Sie unterscheiden sich nur darin, daß Erstere mit AChE und BChE aus Liquor im dort vorliegenden Verhältnis der Aktivitäten beider Enzyme und Letztere mit einem willkürlich gewählten Verhältnis kommerzieller Enzympräparationen aufgenommen wurden.

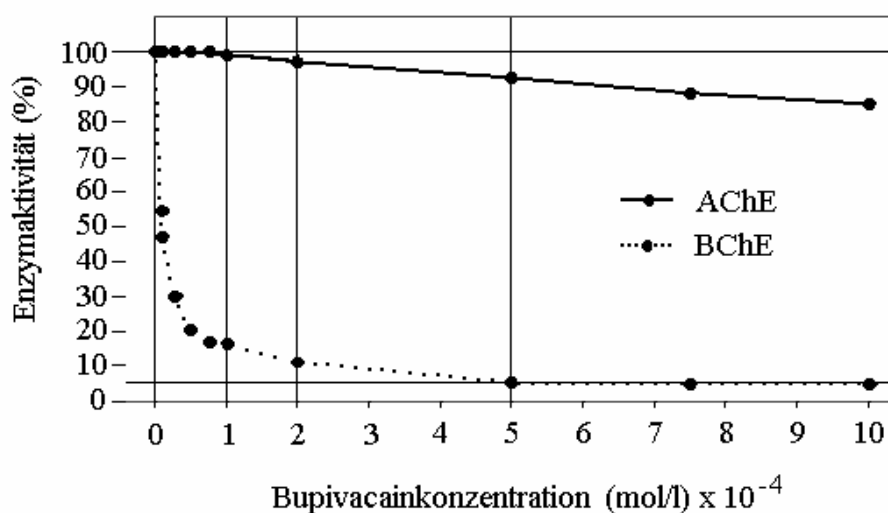
Abbildung A2.1. Aktivitäten gereinigter AChE und BChE (in nmol/min x ml) in Relation zur Substratkonzentration (in mmol/l). AChE hydrolysiert nur ACh; BChE reagiert mit ACh und BCh.



Der Einfluß von Bupivacain auf die Aktivitäten beider Cholinesterasen wurde in Abbildung A2.2 dargestellt. AChE- und BChE-Aktivitäten wurden in separaten Analysen ermittelt. Eine BChE-Hemmung über 95% ihrer Maximalaktivität konnte selbst mit einer Bupivacainkonzentration von 1 mmol/l nicht erreicht werden. Die verbleibende Restaktivität von 5% mußte deshalb zu allen unter Bupivacain-Einfluß gemessenen BChE-Aktivitäten generell addiert werden. Drei verschiedene Bupivacainkonzentrationen (0,1; 0,2 and 0,5 mmol/l), welche BChE

maximal, AChE jedoch minimal hemmen, wurden getestet. Mit 0,1 mmol/l Bupivacain verblieben 99% der AChE- und 20% der BChE-Aktivität (15% gemessene BChE-Aktivität plus 5% generelle Restaktivität bei höheren Bupivacainkonzentrationen). Unter Nutzung von 0,2 mmol/l Bupivacain waren eine 97%-ige AChE-Aktivität und eine 15%-ige BChE-Aktivität (10% gemessen plus 5% generelle Restaktivität) nachweisbar. Bei 0,5 mmol/l Bupivacain wurden 93% AChE-Aktivität und 10% BChE-Aktivität (5% gemessen plus 5% generelle Restaktivität) bestimmt.

Abbildung A2.2. Aktivitäten gereinigter AChE and BChE (in %) unter Einfluß von Bupivacain (Bupivacainkonzentrationen: 0 - 10^{-3} mol/l).



Die folgenden Formeln zur Berechnung der Extinktionsdifferenzen ($\Delta E_{\text{gehemmt}}$) unter den Bedingungen der getesteten Bupivacainkonzentrationen (0,1; 0,2 and 0,5 mmol/l) konnten aus diesen Erkenntnissen abgeleitet werden.

Die Formel für die totale Extinktionsdifferenz ohne Einfluß von Bupivacain (ΔE_{total}) lautet:

$$(1a) \quad \Delta E_{\text{total}} = 1,00 \Delta E_{\text{AChE}} + 1,00 \Delta E_{\text{BChE}}$$

Daraus folgt unter Berücksichtigung der molaren Hemmeffekte:

$$(2a) \quad \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,1} = 0,99 \Delta E_{\text{AChE}} + 0,20 \Delta E_{\text{BChE}}$$

$$(3a) \quad \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,2} = 0,97 \Delta E_{\text{AChE}} + 0,15 \Delta E_{\text{BChE}}$$

$$(4a) \quad \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,5} = 0,93 \Delta E_{\text{AChE}} + 0,10 \Delta E_{\text{BChE}}$$

Nach Extraktion von ΔE_{ChE} :

$$(1b) \quad \Delta E_{\text{ChE}} = \Delta E_{\text{total}} - 1,00 \Delta E_{\text{BChE}}$$

$$(2b) \quad \Delta E_{\text{ChE}} = 1,01 \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,1} - 0,202 \Delta E_{\text{BChE}}$$

$$(3b) \quad \Delta E_{\text{ChE}} = 1,03 \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,2} - 0,155 \Delta E_{\text{BChE}}$$

$$(4b) \quad \Delta E_{\text{ChE}} = 1,055 \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,5} - 0,108 \Delta E_{\text{BChE}}$$

Fügt man Gleichung (1b) in die Gleichungen (2b) bis (4b) ein, resultieren folgende Formeln:

$$(2c) \quad 0,798 \Delta E_{\text{BChE}} = \Delta E_{\text{total}} - 1,01 \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,1}$$

$$(3c) \quad 0,845 \Delta E_{\text{BChE}} = \Delta E_{\text{total}} - 1,03 \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,2}$$

$$(4c) \quad 0,892 \Delta E_{\text{BChE}} = \Delta E_{\text{total}} - 1,055 \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,5}$$

Nach Extraktion von ΔE_{BChE} :

$$(2d) \quad \Delta E_{\text{BChE}} = 1,253 \Delta E_{\text{total}} - 1,266 \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,1}$$

$$(3d) \quad \Delta E_{\text{BChE}} = 1,183 \Delta E_{\text{total}} - 1,219 \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,2}$$

$$(4d) \quad \Delta E_{\text{BChE}} = 1,120 \Delta E_{\text{total}} - 1,182 \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,5}$$

Einfügen der Gleichungen (2d) bis (4d) in die Gleichung (1b):

$$(2e) \quad \Delta E_{\text{ChE}} = \Delta E_{\text{total}} - (1,253 \Delta E_{\text{total}} - 1,266 \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,1})$$

$$(3e) \quad \Delta E_{\text{ChE}} = \Delta E_{\text{total}} - (1,183 \Delta E_{\text{total}} - 1,219 \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,2})$$

$$(4e) \quad \Delta E_{\text{ChE}} = \Delta E_{\text{total}} - (1,120 \Delta E_{\text{total}} - 1,182 \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,5})$$

Endgültige Formeln zur Berechnung von ΔE_{ChE} :

$$(2f) \quad \Delta E_{\text{ChE}} = 1,266 \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,1} - 0,253 \Delta E_{\text{total}}$$

$$(3f) \quad \Delta E_{\text{ChE}} = 1,219 \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,2} - 0,183 \Delta E_{\text{total}}$$

$$(4f) \quad \Delta E_{\text{ChE}} = 1,182 \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,5} - 0,120 \Delta E_{\text{total}}$$

Wie im Abschnitt Methoden beschrieben, muß ΔE_{AChE} mit dem Faktor 65 zur Berechnung der AChE-Aktivität multipliziert werden:

$$(2) \quad AChE \text{ (nmol/min x ml)} = 82,290 \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,1} - 16,445 \Delta E_{\text{total}}$$

$$(3) \quad AChE \text{ (nmol/min x ml)} = 79,235 \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,2} - 11,895 \Delta E_{\text{total}}$$

$$(4) \quad AChE \text{ (nmol/min x ml)} = 76,83 \Delta E_{\text{gehemmt}}^{0,5} - 7,800 \Delta E_{\text{total}}$$

Gereinigte Enzyme

Um die Richtigkeit dieser Formeln zu prüfen, wurden die folgenden Laboruntersuchungen ausgewertet. Proben gereinigter AChE und BChE (bekannte Aktivitäten der Enzyme) wurden in Ringerlösung gemischt. Sodann wurde die AChE-Aktivität mit dem Bupivacain-Hemmtest ermittelt und die Meßergebnisse mit der bekannten Enzymaktivität in der Lösung verglichen. Bei Verwendung von 0,1 mmol/l Bupivacainkonzentration als Hemmstoff konnte eine mittlere Wiedergewinnungsrate von $99,2 \pm 0,8\%$ (94,7 - 103,3%) der ursprünglich eingebrachten AChE-Aktivität registriert werden. Die mittlere Wiederfindungsrate der AChE-Aktivität bei 0,2 mmol/l Bupivacain betrug $99,7 \pm 0,8\%$ (94,0 - 105,0%). Mit einer Hemmstoffkonzentration von 0,5 mmol/l betrug die Wiederfindungsrate der eingesetzten AChE-Aktivität im Mittel $98,2 \pm 1,0\%$ (94,7 - 100,4 %). Die detaillierten Ergebnisse finden sich in Tabelle A2.1. Die mittleren mit dem Bupivacain-Hemmtest gemessenen AChE-Aktivitäten unterschieden sich nicht signifikant von den ursprünglich in das Gemisch der Cholinesterasen eingebrachten Enzymaktivitäten (Mann-Whitney-Test: $p > 0,05$). Es fand sich ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den mittleren Wiederfindungsraten bei Einsatz der drei verwendeten Bupivacainkonzentrationen als Hemmstoff. (Vergleich der individuellen Gruppen untereinander; Mann-Whitney-Test: $p > 0,05$).

Tabelle A2.1. AChE-Aktivität ermittelt mit dem Bupivacain-Hemmtest in einem Gemisch aus gereinigter AChE und BChE.

Bupivacain-konzentration (mmol/l)	n	ursprünglich eingesetzte AChE-Aktivität nmol/min x ml (\pm SEM)	AChE-Aktivität ermittelt mit dem Bupivacain-Hemmtest nmol/min x ml (\pm SEM)
0,1	14	43,5 \pm 1,5 (35,8 - 56,5)	43,2 \pm 1,5 (34,4 - 56,0)
0,2	17	49,7 \pm 2,7 (25,6 - 64,5)	49,5 \pm 2,6 (26,5 - 64,2)
0,5	6	51,2 \pm 6,2 (29,7 - 71,2)	50,2 \pm 6,0 (29,8 - 69,8)

Liquor

Untersuchungen zur Verifizierung des Bupivacain-Hemmtests wurden an humanen Liquores durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit denen simultan vorgenommener Analysen unter Anwendung des Inhibitor-freien Testverfahrens verglichen. In Tabelle A2.2 sind die detaillierten Resultate dargestellt. Im Durchschnitt war die mit dem Inhibitor-freien Test gemessene AChE-Aktivität um durchschnittlich 3% niedriger, als die mit dem Bupivacain-Hemmtest ermittelte Enzymaktivität (Wilcoxon-Test: $p < 0,05$). Diese Differenz wurde einheitlich bei allen drei verwendeten Bupivacainkonzentrationen gefunden. Zur Überprüfung dieser Tendenz wurden 103% der individuellen mit dem Inhibitor-freien Test ermittelten Meßergebnisse berechnet. Bei Vergleich mit den Resultaten des Bupivacain-Hemmtests konnte nunmehr eine statistisch signifikante Übereinstimmung der mittleren AChE-Aktivitäten für beide Methoden festgestellt werden (Wilcoxon-Test: $p > 0,05$).

Tabelle A2.2. Mittlere AChE-Aktivität \pm SEM (nmol/min x ml) in humanen lumbalen Liquores gemessen mit dem Bupivacain-Hemmtest und dem Inhibitor-freien Test (letztere definiert als 100% Enzymaktivität). 3% der individuellen mit dem Inhibitor-freien Test ermittelten Meßergebnisse wurden zu den Originaldaten addiert. Die so berechneten mittleren Enzymaktivitäten (103%) wurden zur Veranschaulichung in der letzten Spalte dargestellt.

Bupivacain-konzentration (mmol/l)	n	AChE-Aktivität			
		Bupivacain-Hemmtest	Inhibitor-freier Test (definiert als 100%)	Berechnete Daten (103%): Ergebnis des Inhibitor-freien Tests + 3%	
		AChE-Aktivität	% gemessen	AChE-Aktivität	AChE-Aktivität
0.1	45	21.6 \pm 0.1 (8.7 - 34.3)	102.8 \pm 0.6	20.9 \pm 0.0 (9.0 - 32.8)	21.6 \pm 1.0 (9.3 - 33.8)
0.2	45	21.5 \pm 0.1 (8.6 - 34.7)	102.4 \pm 0.6	20.9 \pm 0.0 (9.0 - 32.8)	21.6 \pm 1.0 (9.3 - 33.8)
0.5	8	16.6 \pm 1.0 (12.6 - 19.6)	103.4 \pm 1.2	16.1 \pm 1.0 (12.5 - 19.6)	16.6 \pm 1.1 (12.7 - 20.2)

Diskussion

Der in diesem Abschnitt beschriebene Bupivacain-Hemmtest ist eine zuverlässige Methode zur Bestimmung der AChE-Aktivität in Körperflüssigkeiten, welche beide Cholinesterasen enthalten. Die Methode beruht auf der Hemmung der BChE-Aktivität mit Bupivacain als nicht toxische Alternative zu dem etablierten toxischen Inhibitor iso-OMPA [168,253]. Bupivacain erwies sich als relativ selektiver BChE-Inhibitor in Konzentrationen von 1,0 bis $5,0 \times 10^{-4}$ mol/l, wobei die Hemmung der AChE unter 10% der Gesamtaktivität verbleibt. Drei Gleichungen (entsprechend den Bupivacainkonzentrationen 0,1; 0,2 und 0,5 mmol/l) zur Berechnung der AChE-Aktivität wurden aus der Analyse enzymkinetischer Daten (Abbildungen A2.1 und A2.2) abgeleitet.

Die Richtigkeit dieser Formeln wurde zunächst durch eine Testserie unter Verwendung von Gemischen aus gereinigten Cholinesterasen bestätigt. Insgesamt

wurden $99,3 \pm 0,5$ % der ursprünglich eingesetzten AChE in dieser Testserie wiedergefunden. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Testergebnissen und den ursprünglich eingesetzten AChE-Aktivitäten. Dieses Resultat wurde unabhängig von der verwendeten Bupivacainkonzentration (0,1; 0,2 oder 0,5 mmol/l) erzielt.

Weiterhin wurde der Bupivacain-Hemmtest an humanen Liquores getestet. Der Vergleich der prozentualen Wiederfindungsraten der AChE-Aktivität unter Einsatz von 0,1; 0,2 oder 0,5 mmol/l Bupivacain zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen. Alle drei Bupivacainkonzentrationen können deshalb äquivalent zur Analyse eingesetzt werden. Eine Abweichung der Testergebnisse von den mit der Inhibitor-freien Methode erzielten Resultaten konnte jedoch festgestellt werden. Es wurde nachgewiesen, daß die mit dem Inhibitor-freien Test gemessenen AChE-Aktivitäten ca. 3% niedriger ausfielen als die mit dem Bupivacain-Hemmtest gefundenen Resultate. Dieses Ergebnis fand sich unabhängig von der eingesetzten Bupivacainkonzentration. Eine Erklärung dieser Differenz läßt sich folgendermaßen ableiten:

Die Inhibitor-freie Methode beruht auf der Erkenntnis, daß das individuelle Aktivitätsverhältnis der BChE gegenüber den Substraten ACh und BCh im Liquor und Serum bei simultaner Probeentnahme identisch ist. Die Substratkonzentrationen müssen dabei mindestens 5 mmol/l betragen. Durch die vorliegenden Untersuchungen wurde offensichtlich, daß bei 5 mmol/l ACh-Konzentration die AChE-Aktivität bereits moderat durch ihr eigenes Substrat gehemmt wird (Abbildung A2.1). Diese Substrathemmung verursacht offenbar die mit dem Inhibitor-freien Test gemessene ca. 3% niedrigere AChE-Aktivität im Vergleich zum Bupivacain-Hemmtest (Tabelle A2.2). Die AChE-Aktivität wird durch die im Bupivacain-Hemmtest eingesetzten 1 mmol/l ACh jedoch nicht meßbar gehemmt (Abbildung A2.1). Durch Berechnung von 103% der individuellen mit dem Inhibitor-freien Test gemessenen AChE-Aktivitäten (letzte Spalte Tabelle A2.2) konnten die signifikanten Unterschiede der mit den beiden Testverfahren ermittelten Enzymaktivitäten eliminiert werden.

In Anbetracht der minimalen Unterschiede der durch beide Testverfahren ermittelten absoluten AChE-Aktivitäten erscheint es nicht gerechtfertigt, eine kritische Wertung der Genauigkeit beider Tests im Vergleich vorzunehmen. Im

Anhang 1 konnte demonstriert werden, daß die Inhibitor-freie Methode weitgehend identische Ergebnisse im Vergleich zu dem etablierten Differenzverfahren unter Nutzung des AChE-Inhibitors BW284c51 erbringt. Bisher wurde keine Substanz gefunden, die eine komplette Hemmung der BChE-Aktivität ohne gleichzeitige Beeinflussung der AChE bewirkt. Bupivacain ist dabei keine Ausnahme. Es ist daher verständlich, daß jede Methode zur Berechnung der AChE-Aktivität nach Hemmung der einen oder der anderen Cholinesterase mit Nachteilen behaftet ist. Es ist jedoch bei genauer Analyse kinetischer Daten möglich, den prozentualen Anteil unvollständiger BChE-Hemmung und anteiliger AChE-Beeinflussung relativ genau zu ermitteln.

Der Inhibitor-freie Test und der Bupivacain-Hemmtest sind als präzise Methoden zur Bestimmung der AChE-Aktivität im Liquor zu betrachten. Der Inhibitor-freie Test sollte als Methode der Wahl gelten, wenn beide Cholinesterasen im Liquor und die BChE-Aktivität im Serum getestet werden. Zur einfachen Bestimmung der AChE-Aktivität im Liquor eignet sich der materiell weniger aufwendige Bupivacain-Hemmtest. Bupivacain ist ein sicherer und billiger BChE-Inhibitor.

Die BChE-Aktivität kann natürlich unabhängig vom Bupivacain-Hemmtest unter Verwendung des Substrates BCh bei einer Konzentration von 5 mmol/l getestet werden. BChE zeigt seine volle Aktivität erst bei dieser Substratkonzentration (Abbildung A2.1); AChE kann diesen Test wegen seiner Substratspezifität nicht beeinflussen.

Zusammenfassung

Die meisten verfügbaren Testsysteme für die AChE-Aktivität im Liquor nutzen hoch giftige Hemmstoffe, um das Enzym von der gleichzeitig im Liquor nachweisbaren BChE zu differenzieren. Es war Ziel dieser Studie, einen Test zur Analyse der AChE-Aktivität im Liquor unter Nutzung eines ungiftigen Inhibitors für BChE zu entwickeln.

Enzymkinetische Untersuchungen im Zusammenhang mit Medikamentenwirkungen auf die Cholinesteraseaktivitäten haben gezeigt, daß in vitro-Bupivacainkonzentrationen zwischen 0,1 und 0,5 mmol/l eine maximale BChE-Hemmung verursachen, die AChE-Aktivität jedoch nur minimal

beeinflussen. Basierend auf diesen Studien bietet sich Bupivacain als möglicher, nicht giftiger Inhibitor der BChE-Aktivität im in vitro Testverfahren an.

Drei Formeln zur Berechnung der AChE-Aktivität unter BChE-Hemmung mit Bupivacainkonzentrationen 0,1 mmol/l, 0,2 mmol/l und 0,5 mmol/l wurden in dieser Studie abgeleitet. Jede dieser Formeln ermöglicht die Bestimmung der AChE-Aktivität mittels eines Differenzverfahrens in Proben mit und ohne Bupivacain. Das Substrat Acetylthiocholinjodid sollte im Test generell mit einer Konzentration von 1 mmol/l eingesetzt werden. Die Genauigkeit des Bupivacain-Hemmtests wurde durch Untersuchungen an Gemischen gereinigter Cholinesterasen und an humanen Liquores bestätigt.

Der Bupivacain-Hemmtest ist eine zuverlässige spektrophotometrische Bestimmungsmethode für die AChE-Aktivität im Liquor. Der Test nutzt einen sicheren, kostengünstigen und jederzeit verfügbaren Hemmstoff für BChE. Zur Bestimmung der BChE-Aktivität muß ein unabhängiger Test unter Nutzung von Butyrylcholinjodid als Substrat in Konzentration von 5 mmol/l verwendet werden.

Abkürzungen

A4, A12:	asymmetrische Molekülformen der Cholinesterasen
Abb.:	Abbildung(en)
ACh:	Acetylthiocholin(jodid)
AChE:	Acetylcholinesterase
AChE _{CSF} :	Acetylcholinesteraseaktivität im Liquor
AChE _{LU} :	Acetylcholinesteraseaktivität im lumbalen Liquor
AChE _{VE} :	Acetylcholinesteraseaktivität im ventrikulären Liquor
ALAT:	Alanin-Aminotransferase
ALB _{LU} :	Konzentrationen des Albumins im lumbalen Liquor
ALB _{SE} :	Konzentrationen des Albumins im Serum
ALB _{VE} :	Konzentrationen des Albumins im ventrikulären Liquor
BCh:	Butyrylthiocholin(jodid)
BChE:	Butyrylcholinesterase
BChE ^{ACh} _{SE} :	BChE-Aktivität des Serums gegenüber dem Substrat ACh
BChE _{CSF} :	Butyrylcholinesteraseaktivität im Liquor
BChE _{LU} :	Butyrylcholinesteraseaktivität im lumbalen Liquor
BChE _{SE} :	Butyrylcholinesteraseaktivität im Serum
BChE _{VE} :	Butyrylcholinesteraseaktivität im ventrikulären Liquor
BL:	baseline-Probe
BW284c51:	1,5-bis(4-Allyldimethylammoniumphenyl)pentan-3-eins Dibromid
CSF:	cerebrospinal fluid; Liquor cerebrospinalis
CT:	Computertomogramm
DTNB:	5-5'Dithio bis-(2-nitrobenzoesäure) (3,3'-6)
EEG:	Elektroenzephalogramm
F:	Im AChE-Testverfahren angewendeter Faktor, der sich aus resultierenden Volumina der reagierenden Substanzen, dem Endvolumen von 1,8 ml nach Eserinsalizylsäure-Stopp, dem Verdünnungsfaktor der Sera, der Reaktionszeit von 20 min und dem millimolaren Extinktionskoeffizienten von 13,88 ableitet
G1, G2, G4:	globulären Molekülformen der Cholinesterasen

GABA:	Gammaaminobuttersäure
GEW _{LU} :	Gesamteiweißkonzentration des lumbalen Liquors
GEW _{VE} :	Gesamteiweißkonzentration des ventrikulären Liquors
IFN:	Interferon
Ig:	Immunglobulin
IL:	Interleukin
iso-OMPA:	Tetraisopropylpyrophosphoramid
Liquor:	Liquor cerebrospinalis
LZ:	Leukozytenzahl
LZ _{VE} :	Leukozytenzahl im ventrikulären Liquor
Mb.:	Morbus
MRT:	Magnetresonanztomogramm
NSAID:	nichtsteroidale antiinflammatorische Medikamente
QALB _{LU} :	Albuminquotient Liquor/Serum für lumbalen Liquor
QALB _{VE} :	Albuminquotient Liquor/Serum für ventrikulären Liquor
QBChE _{CSF} :	Für das Individuum definierten Aktivitätsverhältnis der BChE für deren Reaktion mit den beiden Substraten ACh und BCh im Liquor
QBChE _{LU} :	Butyrylcholinesterasequotient Liquor/Serum
QBChE _{SE} :	Für das Individuum definierten Aktivitätsverhältnis der BChE für deren Reaktion mit den beiden Substraten ACh und BCh im Serum
Ro 02-0683:	(2-Hydroxy-5-Phenylbenzyl)-Trimethylammoniumbromid - ein Dimethylcarbamat-Inhibitor der BChE
SD:	Standardabweichung des Mittelwertes
SDZ ENA 713:	Rivastigmin (Exelon®) - ein Carbat-Hemmstoff der AChE
SE:	Standardfehler
SEM:	Standardfehler des Mittelwertes
Tab.:	Tabelle(n)
TNF α :	Tumor-Nekrose-Faktor Alpha
ZNS:	Zentralnervensystem
ΔE :	Extinktionsdifferenz
$\Delta E_{ACh_{CSF}}$:	kolorimetrisch als Extinktionsdifferenz gemessene totale Hydrolyserate von ACh im Liquor

$\Delta E_{\text{BCh}_{\text{CSF}}}$:	kolorimetrisch als Extinktionsdifferenz gemessene totale Hydrolyserate von BCh im Liquor
$\Delta E_{\text{ACh}_{\text{SE}}}$:	kolorimetrisch als Extinktionsdifferenz gemessene totale Hydrolyserate von ACh im Serum
$\Delta E_{\text{BCh}_{\text{SE}}}$:	kolorimetrisch als Extinktionsdifferenz gemessene totale Hydrolyserate von BCh im Serum
$\Delta E_{\text{gehemmt}}$:	Extinktionsdifferenz unter dem Einfluß von Bupivacain
ΔE_{total} :	Extinktionsdifferenz ohne den Einfluß von Bupivacain
24h:	24 Stunden-Probe
48h:	48 Stunden-Probe
γ -GT:	Gamma-Glutamyltransferase

Literatur

- [1] Abo V, Viera L, Dajas F. Different functional pools of acetylcholinesterase induce changes in rat locus coeruleus noradrenaline metabolism. *Neurosci Lett* 1992; 141: 111-114.
- [2] Ahonen A, Myllylä VV, Hokkanen E. Cerebrospinal fluid protein findings in various lower back pain syndromes. *Acta Neurol Scand* 1979; 60: 93-99.
- [3] Al-Kassab AS, Vijayakumar E. Profile of serum cholinesterase in systemic sepsis syndrome septic shock in intensive care unit patients. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 11-14.
- [4] Angelov DN. Ultrastructural Characteristics of the Cranial Dura Mater-Arachnoid Interface Layer. *Z Mikrosk Anat Forsch* 1990; 104: 982-990.
- [5] Apkarian RP. The fine structure of fenestrated adrenocortical capillaries revealed by in-lens field-emission scanning electron microscopy and scanning transmission electron microscopy. *Scanning* 1997; 19: 361-367.
- [6] Appleyard M, Jahnsen H. Actions of acetylcholinesterase in the guinea-pig cerebellar cortex in vitro. *Neuroscience* 1992; 47: 291-301.
- [7] Appleyard ME, McDonald B. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in cerebrospinal fluid from different levels of the neuraxis of patients with dementia of the Alzheimers type. *J of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 1992; 55: 1074-1078.
- [8] Appleyard ME, Smith AD, Berman P, Wilcock GK, Esiri MM, Neary D, Bowen DM. Cholinesterase activities in cerebrospinal fluid of patients with senile dementia of the Alzheimer type. *Brain* 1987; 110: 1309-1322.
- [9] Appleyard ME, Smith AD. Spontaneous and Carbachol-evoked in vivo secretion of acetylcholinesterase from the hippocampus of the rat. *Neurochem Int* 1987; 11: 397-406.
- [10] Appleyard ME, Vercher JL, Greenfield SA. Release of acetylcholinesterase from the guinea-pig cerebellum in vivo. *Neuroscience* 1988; 25: 133-138.
- [11] Appleyard ME. Non-cholinergic functions of acetylcholinesterase. *Biochem Soc Trans* 1994; 22: 749-755.
- [12] Arendt T, Bigl V, Walther F, Sonntag M. Decreased ratio of CSF acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase activity in Alzheimer's disease. *Lancet* 1984; 21: 173.
- [13] Arendt T, Brückner MK, Lange M, Bigl V. Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development - a study of molecular forms. *Neurochem Int* 1992; 21: 381-396.
- [14] Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft: Kreuzschmerzen. Therapieempfehlungen der AKDÄ. 2. Aufl. 2000: 5.
- [15] Attack JR, Litvan I, Thal LJ, May C, Rapoport SI, Chase N. Cerebrospinal fluid Acetylcholinesterase in progressive supranuclear palsy: reduced activity relative to normal subjects and lack of inhibition by oral physostigmine. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991; 54: 832-835.
- [16] Attack JR, May C, Kaye JA, Kay AD, Rapoport SI. Cerebrospinal fluid Cholinesterases in aging and in dementia of the Alzheimer type. *Ann Neurol* 1988; 23: 161-167.
- [17] Attack JR, Perry EK, Bonham JR, Candy JM, Perry RH. Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. *J Neurochem* 1987; 47: 263-277.
- [18] Attack JR, Perry EK, Bonham JR, Perry RH. Molecular Forms of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in Human Plasma and Cerebrospinal Fluid. *J Neurochem* 1987; 48: 1845-1850.
- [19] Aurell A, Rosengren LE, Karlsson B, Olsson JE, Zbornikova V, Haglid KG. Determination of S-100 and glial fibrillary acidic protein concentrations in cerebrospinal fluid after brain infarction. *Stroke* 1991; 22: 1254-1258.

- [20] Bahar M, Cole G, Rosen M, Vickers MD. Histopathology of the spinal cord after intrathecal cocaine, bupivacaine, lignocaine and adrenaline in the rat. *Eur J Anaesthesiol* 1984; 1: 293-297.
- [21] Bartolini A, Galli A, Ghelardini C, Giotti A, Malcangio M, Malmberg-Aiello P, Zucchi PL. Antinociception induced by systemic administration of local anaesthetics depends on a central cholinergic mechanism. *Br J Pharmacol* 1987; 92: 711-721.
- [22] Basu PS, Batabyal SK, Bhattacharya A, Datta TK. Cholinesterase activities in cerebrospinal fluid of patients with idiopathic convulsive disorders. *Clin Chim Acta* 1995; 235: 107-112.
- [23] Bazzoni G, Martinez Estrada OM, Dejana E. Molecular Structure and Functional Role of Vascular Tight Junctions. *Trends Cardiovasc Med* 1999; 9: 147-152.
- [24] Bearer EL, Orci L. Endothelial Fenestral Diaphragms: A Quick-Freeze, Deep-Etch Study. *J Cell Biol* 1985; 100: 418-428.
- [25] Berger RJ, Zuccarello M, Keller JT. Nitric oxide synthase immunoreactivity in the rat dura mater. *Neuroreport* 1994; 5: 519-521.
- [26] Bernards CM, Artru AA. Effect of intracerebroventricular picrotoxin and muscimol on intravenous bupivacaine toxicity. Evidence supporting central nervous system involvement in bupivacaine cardiovascular toxicity. *Anesthesiology* 1993; 78: 902-910.
- [27] Biagioni S, Tata AM, Agrati C, Cianfarani F, Augusti-Tocco G. Modulation of cholinergic marker expression by nerve growth factor in dorsal root ganglia. *J Neurosci Res* 2000; 62: 591-599.
- [28] Bigl M, Beck M, Bleyl AD, Bigl V, Eschrich K. Altered phosphofructokinase mRNA levels but unchanged isoenzyme pattern in brains from patients with Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; 76: 411-414.
- [29] Bigl M, Bruckner MK, Arendt T, Bigl V, Eschrich K. Activities of key glycolytic enzymes in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 1999; 106: 499-511.
- [30] Bisby MA. Inhibition of axonal transport in nerves chronically treated with local anaesthetics. *Exp Neurol* 1975; 47: 481-489.
- [31] Bleazard L, Morris R. The effects of cholinergic agonists and antagonists on C-fibre evoked responses in the substantia gelatinosa of neonatal rat spinal cord slices. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 1061-1066.
- [32] Blum MS, Toninelli E, Anderson JM, Balda MS, Zhou J, O'Donnell L, Pardi R, Bender JR. Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines. *Am J Physiol*. 1997; 273: 286-294.
- [33] Boden SD, Davis DO, Dina TS, Patronas NJ, Wiesel SW. Abnormal magnetic resonance scans of the lumbar spine in asymptomatic subjects. A prospective investigation. *J Bone Joint Surg* 1990; 72-A: 403-408.
- [34] Borowiak K. Activity of choline esterases in blood cells and serum and cobalt activated acylase in toxic and non-toxic liver damage. *Ann Acad Med Stetin* 1995; 41: 145-154.
- [35] Boulton M, Flessner M, Armstrong D, Hay J, Johnston M. Lymphatic drainage of the CNS: effects of lymphatic diversion/ligation on CSF protein transport to plasma. *Am J Physiol* 1997; 272: 1613-1619.
- [36] Brimijoin S, Hammond P. Butyrylcholinesterase in human brain and acetylcholinesterase in human serum: Trace enzymes measured by two-site immunoassay. *J Neurochem* 1988; 51: 1227-1231.
- [37] Brisby H, Byrod G, Olmarker K, Miller VM, Aoki Y, Rydevik B. Nitric oxide as a mediator of nucleus pulposus-induced effects on spinal nerve roots. *J Orthop Res* 2000; 18: 815-820.
- [38] Brisby H, Olmarker K, Larsson K, Nutu M, Rydevik B. Proinflammatory cytokines in cerebrospinal fluid and serum in patients with disc herniation and sciatica. *Eur Spine J* 2002; 11: 62-66.

- [39] Brisby H, Olmarker K, Rosengren L, Cederlund CG, Rydevik B. Markers of nerve tissue injury in the cerebrospinal fluid in patients with lumbar disc herniation and sciatica. *Spine* 1999; 24: 742-746.
- [40] Broomfield CA, Maxwell DM, Solana RP, Castro CA, Finger AV, Lenz DE. Protection by butyrylcholinesterase against organophosphorus poisoning in nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 259: 633-638.
- [41] Brown SS, Kalow W, Pilz W, Whittaker M, Woronick CL. The plasma cholinesterases: a new perspective. *Adv Clin Chem* 1981; 22: 1-123.
- [42] Butterworth JF 4th, Brownlow RC, Leith JP, Prielipp RC, Cole LR. Bupivacaine inhibits cyclic-3',5'-adenosine monophosphate production. A possible contributing factor to cardiovascular toxicity. *Anaesthesiology* 1993; 79: 88-95.
- [43] Byrod G, Olmarker K, Konno S, Larsson K, Takahashi K, Rydevik B. A rapid transport route between the epidural space and the intraneural capillaries of the nerve roots. *Spine* 1995; 20: 138-143.
- [44] Byrod G, Otani K, Brisby H, Rydevik B, Olmarker K. Methylprednisolone reduces the early vascular permeability increase in spinal nerve roots induced by epidural nucleus pulposus application. *J Orthop Res* 2000; 18: 983-987.
- [45] Byrod G, Rydevik B, Johansson BR, Olmarker K. Transport of epidurally applied horseradish peroxidase to the endoneurial space of dorsal root ganglia: a light and electron microscopic study. *J Peripher Nerv Syst* 2000; 5: 218-226.
- [46] Byrod G, Rydevik B, Nordborg C, Olmarker K. Early effects of nucleus pulposus application on spinal nerve root morphology and function. *Eur Spine J* 1998; 7: 445-449.
- [47] Carey TS, Evans AT, Hadler NM, Lieberman G, Kalsbeek WD, Jackman AM, Fryer JG, McNutt RA. Acute severe low back pain: a population-based study of prevalence and care-seeking. *Spine* 1996; 21: 339-344.
- [48] Carlock LL, Chen WL, Gordon EB, Killeen JC, Manley A, Meyer LS, Mullin LS, Pendino KJ, Percy A, Sargent DE, Seaman LR, Svanborg NK, Stanton RH, Tellone CI, Van Goethem DL. Regulating and assessing risks of cholinesterase-inhibiting pesticides: divergent approaches and interpretations. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 1999; 2: 105-160.
- [49] Cavanaugh JM, Weinstein JN: Low back pain: epidemiology, anatomy and neurophysiology. In: Wall PD, Melzack R (Hrsg). *Textbook of Pain*. Churchill Livingstone; London, New York 1994: 441-456.
- [50] Checler F, Vincent JP. Peptidasic activities associated with acetylcholinesterase are due to contaminating enzymes. *J Neurochem (United States)* 1989; 53: 924-928.
- [51] Chen WL, Sheets JJ, Nolan RJ, Mattsson JL. Human red blood cell acetylcholinesterase inhibition as the appropriate and conservative surrogate endpoint for establishing chlorpyrifos reference dose. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999; 29: 15-22.
- [52] Chu SY. Depression of serum cholinesterase activity as an indicator for insecticide exposure - consideration of the analytical and biological variations. *Clinical Biochemistry* 1985; 18: 323-326.
- [53] Chubb IW, Goodman S, Smith AD. Is acetylcholinesterase secreted from central neurons into the cerebrospinal fluid? *Neuroscience* 1976; 1: 57-62.
- [54] Chubb IW, Hodgson AJ, White CH. Acetylcholinesterase hydrolyzes substance P. *Neuroscience* 1980; 5: 2065-2072.
- [55] Chubb IW, Hodgson AJ. Release of non-transmitter substances: especially acetylcholinesterase. *Trends Auton Pharmacol* 1982; 2: 61-81.
- [56] Chubb IW. The Release of Non-transmitter Substances. In: Cottrell GA, Usherwood PNR (Hrsg). *Synapses*. Blackie; Glasgow & London 1976: 264-290.
- [57] Clarencon D, Testylier G, Estrade M, Galonnier M, Viret J, Gourmelon P, Fatome M. Stimulated release of acetylcholinesterase in rat striatum revealed by in vivo microspectrophotometry. *Neuroscience* 1993; 55: 457-462.

- [58] Clitherow JW, Mitchard M, Harper NJ. The possible biological function of pseudocholinesterase. *Nature* 1963; 199: 1000.
- [59] Coffey RJ, Rotho AL. Pain-sensitive cranial structures. In: Dalessio DJ (Hrsg). *Wolff's Headache and other pain*. Oxford University Press; Oxford 1987: Kapitel 3.
- [60] Cornefford M, Olmarker K, Farley DB, Weinstein JN, Rydevik B. Neuropeptide changes in compressed spinal nerve roots. *Spine* 1995; 20: 670-673.
- [61] Cornefford M, Olmarker K, Otani K, Rydevik B. Nucleus pulposus-induced nerve root injury: effects of diclofenac and ketoprofen. *Eur Spine J* 2002; 11: 57-61.
- [62] Cornefford M, Olmarker K, Rydevik R, Nordborg C. Mechanical and biochemical injury of spinal nerve roots: a morphological and neurophysiological study. *Eur Spine J* 1996; 5: 187-192.
- [63] Cornefford M, Sato K, Olmarker K, Rydevik B, Nordborg C. A model for chronic nerve root compression studies. Presentation of a porcine model for controlled, slow-onset compression with analyses of anatomic aspects, compression onset rate, and morphologic and neurophysiologic effects. *Spine* 1997; 22: 946-957.
- [64] Coye MJ, Lowe JA, Maddy KT. Biological monitoring of agricultural workers exposed to pesticides: I. Cholinesterase activity determinations. *J Occup Med (United States)* 1986; 28: 619-627.
- [65] Coyle DE and Sperelakis N. Bupivacaine and lidocaine blockade of calcium-mediated slow action potentials in guinea pig ventricular muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 242: 1001-1005.
- [66] Cuello, AC, Sofroniev M. *Neurotransmitters in Action*. Bousfield, D. Hrsg. Amsterdam 1985: Elsevier: 309-318.
- [67] Cutler NR, Polinsky RJ, Sramek JJ, Enz A, Jhee SS, Mancione L, Hourani J, Zolnouri P. Dose-dependent CSF acetylcholinesterase inhibition by SDZ ENA 713 in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 1998; 97: 244-250.
- [68] Dajas F, Silveira R, Costa G, Castello ME, Jerusalinsky D, Medina J, Levesque D, Greenfield S. Differential cholinergic and non-cholinergic actions of acetylcholinesterase in the substantia nigra revealed by fasciculin-induced inhibition. *Brain Res (Netherlands)* 1993; 616: 1-5.
- [69] Davis KL, Goodnick PJ. Cerebrospinal fluid acetylcholinesterase in neuropsychiatric disorders. In: Wood JH (Hrsg). *Neurobiology of Cerebrospinal Fluid*. Plenum Press; New York 1983; 2: 197-203.
- [70] Davson H, Segal MB. *Physiology of the CSF and the blood-brain barriers*. CRS Press 1996: 257-302.
- [71] DeBleeker J, Willems J, VanDen Neucker K, De Reuck J, Vogelaers D. Prolonged toxicity with intermediate syndrome after combined parathion and methyl parathion poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol* 1992; 30: 333-345.
- [72] Delfs JR, Saroff DM, Nishida Y, Friend J, Geula C. Effects of NMDA and its antagonists on ventral horn cholinergic neurons in organotypic roller tube spinal cord cultures. *J Neural Transm* 1997; 104: 31-51.
- [73] Den Blaauween DH, Poppe WA, Tritschler W. Cholinesterase (EC 3.1.1.8) mit Butyrylthiocholin-iodid als Substrat. Referenzwerte in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht unter Berücksichtigung hormonaler Einflüsse und Schwangerschaft. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 381-386.
- [74] Dennhardt R, Konder H. Blood and liquor levels of bupivacaine in spinal anesthesia. *Regional-Anaesthesie* 1983; 6: 72-75.
- [75] Digby JM, Kersley JB. Pyogenic non-tuberculous spinal infection: an analysis of thirty cases. *J Bone Joint Surg* 1979; 61-B: 47-55.
- [76] Driver RP Jr, D'Angelo R, Eisenach JC. Bolus metoclopramide does not enhance morphine analgesia after cesarean section. *Anesth Analg* 1996; 82: 1033-1035.

- [77] Ehrlich G, Viegas-Pequignot E, Ginzberg D, Sindel L, Soreq H, Zakut H. Mapping the human acetylcholinesterase gene to chromosome 7q22 by fluorescent in situ hybridization coupled with selective PCR amplification from a somatic hybrid cell panel and chromosome-sorted DNA libraries. *Genomics* 1992; 13: 1192-1197.
- [78] Eisenach JC, Detweiler D, Tong C, D'Angelo R, Hood D. Cerebrospinal fluid norepinephrine and acetylcholine concentrations during acute pain. *Anesth Analg* 1996; 82: 621-626.
- [79] Elble R, Giacobini E, Scarsella GF. Cholinesterases in cerebrospinal fluid - A longitudinal study in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1987; 44: 403-407.
- [80] Ellman GL, Courtney KD, Andrews Vjr, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961, 7: 88-95.
- [81] Evans RT, O'Callaghan J, Norman A. A longitudinal study of cholinesterase changes in pregnancy. *Clin Chem* 1988; 34: 2249-2252.
- [82] Evans RT. Cholinesterase phenotyping: Clinical aspects and laboratory applications. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1986; 23: 35-64.
- [83] Felgenhauer K. Labordiagnostik neurologischer Erkrankungen. In: Thomas L (Hrsg). *Labor und Diagnose*. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH; Frankfurt/Main 1998: 1344.
- [84] Felgenhauer K. Protein filtration and secretion at human body fluid barriers. *Pflüger Arch* 1980; 384: 9-17.
- [85] Felgenhauer K. Protein size and cerebrospinal fluid composition. *Klin Wochenschr.* 1974; 52: 1158-1164.
- [86] Fernandez HL, Moreno RD, Inestrosa NC. Tetrameric (G4) acetylcholinesterase: structure, localization, and physiological regulation. *J Neurochem* 1996; 66: 1335-1346.
- [87] Fuenmayor L, Smith AD, Vogt M. Acetylcholinesterase in Perfusates of the Cats Cerebral Ventricles. *J Physiol* 1976; 263: 165-166.
- [88] Fujita K, Nagata Y. Effects of dorsal root section and occlusion of dorsal spinal artery on the neurotransmitter candidates in rat spinal cord. *Neurochem Res* 1989; 14: 399-404.
- [89] Funnell HS, Oliver WT. Proposed physiological function for plasma cholinesterase. *Nature* 1965; 208: 689.
- [90] Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998; 141: 1539-1550.
- [91] Geisslinger G, Muth-Selbach U, Coste O, Vetter G, Schrodter A, Schaible HG, Brune K, Tegeder I. Inhibition of noxious stimulus-induced spinal prostaglandin E2 release by flurbiprofen enantiomers: a microdialysis study. *J Neurochem* 2000; 74: 2094-2100.
- [92] George ST, Balasubramanian AS. The aryl acylamidases and their relationship to cholinesterases in human serum, erythrocyte and liver. *Eur J Biochem* 1981; 121: 177-186.
- [93] George W, Wood II. Lower back pain and disorders of intervertebral disc. In: Canale ST (Hrsg). *Campbell's Operative Orthopaedics*. Mosby; St. Louis, Baltimore, Boston, Carsbad, Chicago, Naples, New York, Philadelphia, Portland, London, Madrid, Mexico City, Singapore, Sydney, Tokyo, Toronto, Wiesbaden 1998: 3018-3019.
- [94] Gomez S, Davous P, Rondot P, Faivre-Bauman A, Valade D, Puymirat J. Somatostatin-like immunoreactivity and acetylcholinesterase activities in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease and senile dementia of the Alzheimer type. *Psychoneuroendocrinology* 1986; 11: 69-73.
- [95] Gomez-Ramos P, Bouras C, Moran MA. Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase on neurofibrillary degeneration sites in the brain of aged and Alzheimer's disease patients. *Brain Research* 1994; 640: 17-24.
- [96] Graham SG, Crossley AW. The characteristics of the inhibition of serum cholinesterase by metoclopramide. *Eur J Clin Pharmacol* 1995; 48: 225-228.

- [97] Greenfield SA, Chubb IW, Grunewald RA, Henderson Z, May J, Portnoy S, Weston J, Wright MC. A non-cholinergic function for acetylcholinesterase in the substantia nigra: behavioural evidence. *Exp Brain Res* 1984; 54: 513-520.
- [98] Greenfield SA, Smith AD. Changes in the acetylcholinesterase concentration in rabbit cerebrospinal fluid following central electrical stimulation. *J Physiol* 1976; 258: 108-109.
- [99] Greenfield SA, Smith AD. The influence of electrical stimulation of certain brain regions on the concentration of Acetylcholinesterase in rabbit cerebrospinal fluid. *Brain Research* 1979; 177: 445-459.
- [100] Greenfield SA. A Noncholinergic Action of Acetylcholinesterase (AChE) in the Brain: From neuronal Secretion to the Generation of Movement. *Cellular and Molecular Neurobiology* 1991; 11: 55-77.
- [101] Greitz D, Franck A, Nordell B. On the pulsatile nature of intracranial and spinal CSF-circulation demonstrated by MR imaging. *Acta Radiol* 1993; 34: 321-328.
- [102] Greitz D, Hannerz J. A proposed model of cerebrospinal fluid circulation: observations with radionuclide cisternography. *AJNR Am J Neuroradiol* 1996; 17: 431-438.
- [103] Gupta RC, Dave SK, Shah MP, Kashyap SK. A monitoring study of workers handling pesticides in warehouses and godowns. *J Environ Sci Health* 1979; 14: 405-416.
- [104] Haber B, Grossmann RG: Acetylcholine metabolism in intracranial and lumbar cerebrospinal fluid and in blood. In: Wood JH (Hrsg). *Neurobiology of Cerebrospinal Fluid* 1. Plenum Press; New York and London 1980: 345-350.
- [105] Hakelius A. Prognosis in sciatica. A clinical follow-up of surgical and non-surgical treatment. *Acta Orthop Scand Suppl* 1970; 129: 1-76.
- [106] Hall-Craggs EC. Early ultrastructural changes in skeletal muscle exposed to the local anaesthetic bupivacaine (Marcaine). *Br J Exp Pathol* 1980; 61: 139-149.
- [107] Hartikainen P, Reinikainen KJ, Soininen H, Sirvio J, Soikelli R, Riekkinen PJ. Neurochemical markers in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimers disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis and normal controls. *J Neural Transm* 1992; 4: 53-69.
- [108] Hartikainen P, Soininen H, Partanen J, Helkala EL, Riekkinen P. Aging and spectral analysis of EEG in normal subjects: a link to memory and CSF AChE. *Acta Neurol Scand* 1992, 86: 148-155.
- [109] Hartmann W, Kluge H, Zahlten W. Assessment of prealbumin in cerebrospinal fluid. *Psychiatr Neurol Med Psychol* 1987; 39: 145-150.
- [110] Hartvig P, Wiklund L, Aquilonius SM, Lindström B. Clinical pharmacokinetics of acetylcholinesterase inhibitors. In: Aquilonius SM, Gillberg PG (Hrsg). *Progress in Brain Research*. Elsevier Science Publishers B.V. 1990; 84: 139-143.
- [111] Henry-Feugeas MC, Idy-Peretti I, Blanchet B, Hassine D, Zannoli G, Schouman-Claeys E. Temporal and spatial assessment of normal cerebrospinal fluid dynamics with MR imaging. *Magn Reson Imaging*. 1993; 11: 1107-1118.
- [112] Holmes JH, Kanfer I, Zwarenstein H. Effect of benzodiazepine derivatives on human blood cholinesterase in vitro. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1978; 21: 367-370.
- [113] Hood D, Mallak K, James R, Tuttle R, Eisenach J. Enhancement of analgesia from systemic opioid in humans by spinal cholinesterase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282: 86-92.
- [114] Hood DD, Eisenach JC, Tuttle R. Phase I safety assessment of intrathecal neostigmine methylsulfate in humans. *Anesthesiology* 1995; 82: 331-343.
- [115] Huff FJ, Maire JC, Growdon JH, Corcin S, Wurtmann RC. Cholinesterases in cerebrospinal fluid-correlations with clinical measures in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1986; 72: 121-129.
- [116] Huff FJ, Reiter CT, Protetch J. Activities and kinetic properties of lumbar cerebrospinal fluid cholinesterases in relation to clinical diagnosis, severity, and progression of Alzheimer's disease. *Can J Neurol Sci* 1989; 16: 406-410.

- [117] Inestrosa NC, Perelman A Association of acetylcholinesterase with the cell surface. *J Membr Biol* 1990; 118: 1-9.
- [118] Irestedt L, Andreen M, Belfrage P, Fagerström T. The elimination of bupivacaine after short intravenous infusion in the dog: with special reference to the role played by the liver and lungs. *Acta Anaesthesiol Scand* 1978; 22: 413-422.
- [119] Iwamoto ET, Marion L. Characterization of the antinociception produced by intrathecally administered muscarinic agonists in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 266: 329-38.
- [120] Janke C, Beck M, Stahl T, Holzer M, Brauer K, Bigl V, Arendt T. Phylogenetic diversity of the expression of the microtubule-associated protein tau: implications for neurodegenerative disorders. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 68: 119-128.
- [121] Jessel TM, Mudge AW, Leeman SE and Yaksh TL. Release of substance P and somatostatin in vivo from primary afferent terminals in mammalian spinal cord. *Neurosci Abs* 1979; 5: 611.
- [122] Johnson S, Domino EF. Cholinergic enzymatic activity of cerebrospinal fluid of patients with various neurologic disorders. *Clinica Chim Acta* 1971; 35: 421-428.
- [123] Jokanovic M, Maksimovic M. Abnormal cholinesterase activity: understanding and interpretation. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35: 11-16.
- [124] Kagevi I, Wahlby L. CSF concentrations of ranitidine. *Lancet* 1985; 1: 164-165.
- [125] Kalow W, Genest K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase. Determination of dibucaine numbers. *Can J Biochem* 1957; 35: 339-346.
- [126] Kambam JR, Franks JJ. Cimetidine does not affect plasma cholinesterase activity. *Anesth Analg* 1988; 67: 69-70.
- [127] Kao YJ, Tellez J, Turner DR. Dose-dependent effect of metoclopramide on cholinesterases and suxamethonium metabolism. *Br J Anaesth* 1990; 65: 220-224.
- [128] Katz MA. Structural change in fiber matrix allows for enhanced permeability and reduced hydraulic conductivity. *Microvasc Res* 1992; 43: 1-6.
- [129] Kawakatsu S, Morinobu S, Shinohara M, Totsuka S, Kobashi K. Acetylcholinesterase activities and monamine metabolite levels in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer type. *Biol Psychiatry* 1990; 28: 387-400.
- [130] Kawamata T, Takeshita M, Ujiie H, Sato K, Izawa M, Kagawa M, Takakura K. Acetylcholine determination of cerebrospinal fluid in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Surg Neurol* 1994; 41: 399-404.
- [131] Kerem A, Kronman C, Bar-Nun S, Shafferman A, Velan B. Interrelations between assembly and secretion of recombinant human acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 1993; 268: 180-184.
- [132] Kikuchi S, Konno S, Kayama S, Sato K, Olmarker K. Increased resistance to acute compression injury in chronically compressed spinal nerve roots. An experimental study. *Spine* 1996; 21: 2544-2550.
- [133] Kluge H, Hartmann W, Mertins B and Wieczorek V: Correlation between protein data in normal lumbar CSF and morphological findings of choroid plexus epithelium: a biochemical corroboration of barrier transport via tight junction pores. *J Neurol* 1986; 233: 195-199.
- [134] Kluge HH, Kluge WH, Hartmann W. An inhibitor-free assay of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the cerebrospinal fluid. *Clinica Chimica Acta* 1999; 282: 135-145.
- [135] Kluge WH, Kluge HH, Bauer HI, Pietsch S, Anders J, Venbrocks R. Acetylcholinesterase assay for cerebrospinal fluid using bupivacaine to inhibit butyrylcholinesterase. *BMC Biochemistry* 2001; 2: 17.
- [136] Kluge WH, Kluge HH, Hochstetter A, Vollandt R, Bauer HI, Venbrocks R. Butyrylcholinesterase in Lumbar and Ventricular Cerebrospinal Fluid. *Acta Neurol Scand* 2001; 104: 17-23.

- [137] Kluge WH, Kluge HH, Hochstetter A, Vollandt R, Seidel F, Venbrocks R. Acetylcholinesterase in lumbar and ventricular cerebrospinal fluid. *Clinica Chimica Acta* 2001; 305: 55-63.
- [138] Kluge WH, Kluge HH, König U, Venbrocks R, Bauer HI, Sölch O. Blut-Liquor-Schrankenfunktion und Cholinesteraseaktivitäten im Liquor bei degenerativen Veränderungen der lumbalen Wirbelsäule. *Orthopäde* 2002; 31: 568-574.
- [139] Kluge WH, Kluge HH, König U, Venbrocks RA, Bauer HI, Lange M. Effect of Bupivacaine application on cholinesterase activity, total protein- and albumin concentration in serum and CSF. *The Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2002; akzeptiert am 28.08.2002.
- [140] Kobayashi S, Yoshizawa H, Hachiya Y, Ukai T, Morita T. Vasogenic edema induced by compression injury to the spinal nerve root. Distribution of intravenously injected protein tracers and gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging. *Spine* 1993; 18: 1410-1424.
- [141] Koelle GB, Massoulie J, Eugene D, Melone MA, Boulla G. Distributions of molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in nervous tissue of the cat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7749-7752.
- [142] Koenigsberger C, Hammond P, Brimijoin S. Developmental expression of acetyl- and butyrylcholinesterase in the rat: enzyme and mRNA levels in embryonic dorsal root ganglia. *Brain Res* 1998; 787: 248-258.
- [143] Kopeikina LT, Kamper EF, Siafaka I, Stavridis J. Modulation of synaptosomal plasma membrane-bound enzyme activity through the perturbation of plasma membrane lipid structure by bupivacaine. *Anesth Analg* 1997; 85: 1337-1343.
- [144] Koponen HJ, Sirvio J, Lepola U, Leinonen E, Riekkinen PJ. A long-term follow-up study of cerebrospinal fluid acetylcholinesterase in delirium. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1994; 243: 347-351.
- [145] Kraus JF, Franti CE, Riggins RS, Richards D, Borhani NO. Incidence of traumatic spinal cord lesions. *J Chron Dis* 1975; 28: 471-492.
- [146] Kreutzberg GW und Toth L. Dendritic Secretion: A way for the Neuron to communicate with the Vasculature. *Naturwissenschaften* 1974; 61: 37.
- [147] Kreutzberg GW, Toth L, Kaiya H. Acetylcholinesterase as a marker for dendritic transport and dendritic secretion. In: Kreutzberg GW (Hrsg). *Advances in Neurology. Physiology and Pathology of Dendrites*. Raven Press; New York 1975; 12: 269-281.
- [148] Krisch B, Leonhardt H, Oksche A. Compartments and perivascular arrangement of the meninges covering the cerebral cortex of the rat. *Cell Tissue Res*. 1984; 238: 459-474.
- [149] Krisch B. The functional and structural borders between the CSF- and blood-dominated milieus in the choroid plexuses and the area postrema of the rat. *Cell Tissue Res* 1986; 245: 101-115.
- [150] Krugel U, Bigl V, Eschrich K, Bigl M. Deafferentation of the septo-hippocampal pathway in rats as a model of the metabolic events in Alzheimer's disease. *Int J Dev Neurosci* 2001; 19: 263-277.
- [151] Kumar V, Giacobini E, Markwell S. CSF choline and acetylcholinesterase in early-onset vs. late-onset Alzheimer's disease patients. *Acta Neurol Scand* 1989; 80: 461-466.
- [152] Lampugnani MG, Dejana E. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 674-682.
- [153] Lance JW. *Mechanism and Management of Headache*. Oxford 1993. Butterworth-Heinemann; Kapitel 1.
- [154] Lange CM. Untersuchungen zur Validität der Cholinesteraseaktivitäten im Liquor cerebrospinalis als antemortale Marker der Alzheimer'schen Demenz. Dissertation doctor medicinae Karl-Marx-University Leipzig 1989.
- [155] Lawrenson JG, Reid AR, Ghabriel MN, Allt G. Dural microvessels: molecular properties of their luminal anionic sites. *J Neurol Sci* 1996; 139: 117-124.

- [156] Layer PG. Cholinesterases during development of the avian nervous system. *Cell Mol Neurobiol* 1991; 11: 7-33.
- [157] Lehmann H, Silk E. Succinylmonocholine. *Br Med J* 1953; 1: 767.
- [158] Leonhardt H. Ependym und circumventriculäre Organe. In: Oschke A, Vollrath L (Hrsg). *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Vol. 4: Nervensystem. Teil 10: Neuroglia.* Springer; Berlin, Heidelberg, New York 1980: 177-544.
- [159] Lepage L, Schiele F, Gueren R, Siest G. Total cholinesterase in serum: biological variations and reference limits. *Clin Chem* 1985; 31: 546-550.
- [160] Levick JR, Smaje LH. An analysis of the permeability of a fenestra. *Microvasc Res.* 1987; 33: 233-256.
- [161] Li Y, Camp S, Rachinsky TL, Getman D, Taylor P. Gene structure of mammalian acetylcholinesterase. Alternative exons dictate tissue-specific expression. *J Biol Chem* 1991; 266: 23083-23090.
- [162] Lidslot L, Olmarker K, Kayama S, Larsson K, Rydevik B. Nucleus pulposus inhibits the axonal outgrowth of cultured dorsal root ganglion cells. *Eur Spine J* 2000; 9: 8-13.
- [163] Lockridge O, Bartels CF, Vaughan TA, Wong CK, Norton SE, Johnson LL. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J Biol Chem* 1987; 262: 549-557.
- [164] Lockridge O. Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmacol Ther* 1990; 47: 35-60.
- [165] Lockridge O. Substance P hydrolysis by human serum cholinesterase. *J Neurochem* 1982; 39: 106.
- [166] Mäder M, Soerensen K, Wiedmann T, Dickmann U and Felgenhauer K. Neuronal acetylcholinesterase levels in cerebrospinal fluid and serum determined by a specific and sensitive immunoassay. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29: 51-55.
- [167] Magarian EO, Dietz AJ. Correlation of cholinesterase with serum lipids and lipoproteins. *J Clin Pharmacol* 1987; 27: 819-220.
- [168] Manyam BV, Giacibini E, Colliver JA. Cerebrospinal fluid acetylcholinesterase and choline measurements in Huntington's disease. *J Neurol* 1990; 237: 281-284.
- [169] Marchot P, Khelif A, Ji YH, Mansuelle P, Bougis P. Binding of 125I-fasciculin to rat brain acetylcholinesterase. The complex still binds diisopropyl fluorophosphate. *J Biol Chem (United States)* 1993; 268: 12458-12467.
- [170] Markowitz S, Saito K, Moskowitz MA. Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain. *J Neurosci* 1987; 7: 4129-4136.
- [171] Massoulié J, Pezzemanti L, Bon S, Krejci E, Vallette FM. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol* 1993; 41: 31-91.
- [172] Mather LE. Disposition of mepivacaine and bupivacaine enantiomers in sheep. *British Journal of Anesthesia* 1991; 67: 239-246.
- [173] McQueen MJ. Clinical and analytical considerations in the utilization of cholinesterase measurements. *Clin Chim Acta* 1995; 237: 91-105.
- [174] Mense S: Pathophysiologie des Rückenschmerzes und seine Chronifizierung. Tierexperimentelle Daten und neue Konzepte. *Schmerz* 2001; 15: 413-417.
- [175] Mesulam MM, Geula C, Moran MA. Anatomy of cholinesterase inhibition in Alzheimer's disease: effect of physostigmine and tetrahydroaminoacridine on plaques and tangles. *Ann Neurol* 1987; 22: 683-691.
- [176] Meyer J, Nolte H. Concentrations of Bupivacaine in the CSF following subdural application. *Regional-Anaesthesia* 1978; 1: 38-40.
- [177] Meyer-Tuve A, Malcangio M, Ebersberger A, Mazario J, Schaible HG. Effect of brain-derived neurotrophic factor on the release of substance P from rat spinal cord. *Neuroreport* 2001; 12: 21-24.

- [178] Michaelson S, Small DH. A protease is recovered with a dimeric form of acetylcholinesterase in fetal bovine serum. *Brain Res (Netherlands)* 1993; 611: 75-80.
- [179] Michel CC. Capillary permeability and how it may change. *J Physiol* 1988; 404: 1-29.
- [180] Midtling JE, Barnett PG, Coye MJ, Velasco AR, Romero P, Clements CL, O'Malley MA, Tobin MW, Rose TG, Monosson IH. Clinical management of field worker organophosphate poisoning. *West J Med.* 1985; 142: 514-518.
- [181] Milici AJ, Peters KR, Palade GE. The endothelial pocket. A new structure in fenestrated endothelia. *Cell Tissue Res* 1986; 244: 493-499.
- [182] Miller JA, Schmatz C, Schultz AB. Lumbar disc degeneration: correlation with age, sex and spine level in 600 autopsy specimens. *Spine* 1988; 13: 173-178.
- [183] Minamoto Y, Nakamura K, Toda H, Miyawaki I, Kitamura R, Vinh VH, Hatano Y, Mori K. Suppression of acetylcholine-induced relaxation by local anesthetics and vascular NO-cyclic GMP system. *Acta Anaesthesiol Scand* 1997; 41: 1054-1060.
- [184] Mitic LL, Anderson JM. Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 121-142.
- [185] Miura M, Kato S, von Ludinghausen M. Lymphatic drainage of the cerebrospinal fluid from monkey spinal meninges with special reference to the distribution of the epidural lymphatics. *Arch Histol Cytol* 1998; 61: 277-286.
- [186] Mixter WJ, Barr JS. Rupture of the intervertebral disc with involvement of the spinal canal. *New England Journal of Medicine* 1934; 211: 210-215.
- [187] Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* 1999; 147: 185-194.
- [188] Naguib M, Magboul MMA, Samarkandi AH, Attia M. Adverse effects and drug interactions associated with local and regional anaesthesia. *Drug Saf* 1998; 18: 221-250.
- [189] Nakano S, Kato T, Nakamura S, Kameyama M. Acetylcholinesterase activity in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and senile dementia. *J Neurol Sci* 1986; 75: 213-223.
- [190] Nelson TC, Burritt MF. Pesticide poisoning, succinylcholine-induced apnea, and pseudocholinesterase. *Mayo Clin Proc* 1986; 61: 750-752.
- [191] Neumann P, Keller T, Ekstrom L, Hult E, Hansson T. Structural properties of the anterior longitudinal ligament: correlation with lumbar bone mineral content. *Spine* 1993; 18: 637-645.
- [192] Nitz WR, Bradley WG Jr, Watanabe AS, Lee RR, Burgoyne B, O'Sullivan RM, Herbst MD. Flow dynamics of cerebrospinal fluid: assessment with phase-contrast velocity MR imaging performed with retrospective cardiac gating. *Radiology (United States)* 1992; 183: 395-405.
- [193] Nonaka I, Takagi A, Ishiura S, Nakase H, Sugita H. Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine). *Acta Neuropathol (Berl)* 1983; 60: 167-174.
- [194] Nosaka K. Changes in serum enzyme activities after injection of bupivacaine into rat tibialis anterior. *J Appl Physiol* 1996; 81: 876-884.
- [195] Oikarinen R, Molnar GK, Kalimo H, Riekkinen PJ. Cholinesterase activities in the somatic nervous system of rabbits with experimental allergic neuritis. *Exp Neurol* 1983; 79: 601-610.
- [196] Olmarker K, Larsson K. Tumor necrosis factor alpha and nucleus-pulposus-induced nerve root injury. *Spine* 1998; 23: 2538-2544.
- [197] Olmarker K, Rydevik B. Selective inhibition of tumor necrosis factor-alpha prevents nucleus pulposus-induced thrombus formation, intraneural edema, and reduction of nerve conduction velocity: possible implications for future pharmacologic treatment strategies of sciatica. *Spine* 2001; 26: 863-869.

- [198] Olmarker K, Rydevik B, Holm S. Edema formation in spinal nerve roots induced by experimental, graded compression. An experimental study on the pig cauda equina with special reference to differences in effects between rapid and slow onset of compression. *Spine* 1989; 14: 569-573.
- [199] Olmarker K, Rydevik B. [New information concerning pain caused by herniated disk and sciatica. Exposure to disk tissue sensitizes the nerve roots] *Lakartidningen* 1998; 95: 5618-5622.
- [200] Olmarker K: Radikuläre Schmerzen. *Schmerz* 2001; 15: 425-429.
- [201] Ostergaard D, Samsoe Jensen F, Voby-Mogensen J. Pseudocholinesterase deficiency and anticholinesterase toxicity. In: Ballantyne B, Marrs TC (Hrsg). *Clinical & experimental toxicology of organophosphates and carbamates*. Butterworth-Heinemann; Oxford 1992: 520-527.
- [202] Pan HL, Song HK, Eisenach JC. Effects of intrathecal neostigmine, bupivacaine, and their combination on sympathetic nerve activity in rats. *Anesthesiology* 1998; 88: 481-486.
- [203] Panchenko NI, Guseva NR, Maslennikova NK, Danko AI, Protsenko VN. Enzyme diagnosis of liver dysfunction in acute myocardial infarct and its complications. *Klin Lab Diagn* 1993; 4: 37-41.
- [204] Pearlson GD, Tune LE. Cerebral ventricular size and cerebrospinal fluid acetylcholinesterase levels in senile dementia of the Alzheimer type. *Psychiatry Res* 1986; 17: 23-29.
- [205] Quencer RM, Post MJ, Hinks RS. Cine MR in the evaluation of normal and abnormal CSF flow: intracranial and intraspinal studies. *Neuroradiology* 1990; 32: 371-391.
- [206] Quinn DM. Acetylcholinesterase: Enzyme structure, reaction dynamics and virtual transition states. *Chem Rev* 1987; 87: 955-979.
- [207] Rasmussen AG, Adolfsson R, Karlsson T. A new Method specific for acetylcholinesterase in cerebrospinal fluid: Application to Alzheimer's disease. *Lancet* 1988; 193: 571-572.
- [208] Raveh L, Grauer E, Grunwald J, Cohen E, Ashani Y. The stoichiometry of protection against soman and VX toxicity in monkeys pre-treated with human butyrylcholinesterase. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 145: 43-53.
- [209] Risau W, Hallmann R, Albrecht U, Henke-Fahle S. Brain induces the expression of an early cell surface marker for blood-brain barrier-specific endothelium. *EMBO J* 1986; 5: 3179-3183.
- [210] Rosengren LE, Karlsson JE, Karlsson JO, Persson LI, Wikkelso C. Patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases have increased levels of neurofilament protein in CSF. *J Neurochem* 1996; 67: 2013-2018.
- [211] Rosengren LE, Wikkelso C, Hagberg L. A sensitive ELISA for glial fibrillary acidic protein: application in CSF of adults. *J Neurosci Methods* 1994; 51: 197-204.
- [212] Rostgaard J, Qvortrup K. Electron Microscopic Demonstrations of Filamentous Molecular Sieve Plugs in Capillary Fenestrae. *Microvasc Res* 1997; 53: 1-13.
- [213] Rotundo RL. Asymmetric acetylcholinesterase is assembled in the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 479-483.
- [214] Ruberg M, Rieger F, Villageois A, Bonnet AM, Agid Y. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in frontal cortex and cerebrospinal fluid of demented and non-demented patients with Parkinson's disease. *Brain Res* 1986; 362: 83-91.
- [215] Ruberg M, Villageois A, Bonnet AM, Pillon B, Rieger F, Agid Y: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity in the cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative diseases involving cholinergic systems. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987; 50: 538-543.
- [216] Ruberg M, Villageois A, Bonnet AM, Rieger F, Agid Y, Fahn S. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in cerebrospinal fluid from patients with dystonia. *Adv Neurol* 1988; 50: 211-213.

- [217] Rydevik B, McLean WG, Sjostrand J, Lundborg G. Blockage of axonal transport induced by acute, graded compression of the rabbit vagus nerve. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1980; 43: 690-698.
- [218] Sadeh M, Stern LZ, Czyzewski K. Changes in end-plate cholinesterase and axons during muscle degeneration and regeneration. *J Anat* 1985; 140: 165-176.
- [219] Sakaguchi K, Akahori F, Shirai M, Masaoka T, Arishima K, Kounenis G. Effect of combined fenthion and cimetidine use in rats on lethality, blood cholinesterase activities, and serum cholinesterase isoenzymes. *Vet Hum Toxicol* 1998; 40: 77-82.
- [220] Sanchez-Chapula J. Effects of bupivacaine on membrane currents of guinea pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 1988; 156: 303-308.
- [221] Satoh K, Konno S, Nishiyama K, Olmarker K, Kikuchi S. Presence and distribution of antigen-antibody complexes in the herniated nucleus pulposus. *Spine* 1999; 24: 1980-1984.
- [222] Schaible HG, Ebersberger A, Von Banchet GS. Mechanisms of pain in arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 343-354.
- [223] Schaible HG, Neugebauer V, Geisslinger G, Beck U. The effects of S- and R-flurbiprofen on the inflammation-evoked intraspinal release of immunoreactive substance P--a study with antibody microprobes. *Brain Res* 1998; 798: 287-293.
- [224] Schmidley JW, Wissig SL. Anionic Sites on the Luminal Surface of Fenestrated and Continuous Capillaries of the CNS. *Brain Res* 1986; 363: 265-271.
- [225] Schmidt E, Schmidt FW. Enzyme diagnosis of liver diseases. *Clin Biochem* 1993; 26: 241-251.
- [226] Schnitzer JE. Update on the Cellular and Molecular Basis of Capillary Permeability. *Trends Cardiovasc Med* 1993; 3: 124-130.
- [227] Schochat T, Jäckel WH. Rückenschmerzen aus epidemiologischer Sicht. *Manuelle Medizin* 1998; 36: 48-54.
- [228] Schulz M, Schmoldt A. Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 500 drugs. *Pharmazie (Germany)* 1997; 52: 895-911.
- [229] Schwarz M, Glick D, Loewenstein Y, Soreq H. Engineering of human cholinesterases explains and predicts diverse consequences of administration of various drugs and poisons. *Pharmacol Ther* 1995; 67: 283-322.
- [230] Second von Banchet G G, Petrow PK, Brauer R, Schaible HG. Monoarticular antigen-induced arthritis leads to pronounced bilateral upregulation of the expression of neurokinin 1 and bradykinin 2 receptors in dorsal root ganglion neurons of rats. *Arthritis Res* 2000; 2: 424-427.
- [231] Seybold VS. Distribution of histaminergic, muscarinic and serotonergic binding sites in cat spinal cord with emphasis on the region surrounding the central canal. *Brain Res* 1985; 342: 291-296.
- [232] Shafer SL, Eisenach JC, Hood DD, Tong C. Cerebrospinal fluid pharmacokinetics and pharmacodynamics of intrathecal neostigmine methylsulfate in humans. *Anesthesiology* 1998; 89: 1074-1088.
- [233] Shen ZX. The significance of the activity of CSF cholinesterases in dementias. *Med Hypotheses* 1996; 47: 363-376.
- [234] Singer HS, Oshida L, Coyle JT. CSF Cholinesterase activity in Gilles de la Tourette's Syndrome. *Arch Neurol* 1984; 41: 756-757.
- [235] Sirviö J, Kutvonen R, Soininen H, Hartikainen P, Riekkinen PJ. Cholinesterases in the cerebrospinal fluid, serum, and erythrocytes of patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 1989; 75: 119-127.
- [236] Sirviö J, Soininen HS, Kutvonen R, Hyttinen JM, Helkala EL, Riekkinen PJ. Acetyl- and butyrylcholinesterase activity in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1987; 81: 273-279.

- [237] Skouen JS, Brisby H, Otani K, Olmarker K, Rosengren L, Rydevik B. Protein markers in cerebrospinal fluid in experimental nerve root injury. A study of slow-onset chronic compression effects or the biochemical effects of nucleus pulposus on sacral nerve roots. *Spine* 1999; 24: 2195-2200.
- [238] Skouen JS, Larsen JL, Vollset E, Gronning M. Elevated cerebrospinal fluid proteins in sciatica caused by disc herniation. *Eur Spine J* 1994; 3: 107-111.
- [239] Skouen JS, Larsen JL, Vollset SE. Cerebrospinal fluid protein concentrations related to clinical findings in patients with sciatica caused by disk herniation. *J Spinal Disord* 1994; 7: 12-18.
- [240] Skouen JS, Larsen JL, Vollset SE. Cerebrospinal fluid proteins as indicators of nerve root compression in patients with sciatica caused by disc herniation. *Spine* 1993; 18: 72-79.
- [241] Small DH, Michaelson S, Marley PD, Friedhuber A, Hocking A, Livett BG. Regulation of acetylcholinesterase secretion from perfused bovine adrenal gland and isolated bovine chromaffin cells. *J Auton Nerv Syst* 1993; 42: 131-141.
- [242] Soreq H, Lapidot-Lifson Y, Zakut H. A role for cholinesterases in tumorigenesis. *Cancer Cells* 1991; 3: 511-516.
- [243] Sramek JJ, Cutler NR. RBC cholinesterase inhibition: a useful surrogate marker for cholinesterase inhibitor activity in Alzheimer disease therapy? *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2000; 14: 216-227.
- [244] Stevenson BR, Keon BH. The tight junction: morphology to molecules. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998; 14: 89-109.
- [245] Sturrock JE, Nunn JF. Cytotoxic effects of procaine, lignocaine and bupivacaine. *Br J Anaesth* 1979; 51: 273-81.
- [246] Szilagyi AK, Nemeth A, Martini E, Lendvai B, Venter V. Serum and CSF cholinesterase activity in various kinds of dementia. *Eur Arch Psychiatr Neurol Sci* 1987; 230: 309-311.
- [247] Szypryt EP, Twining P, Wilde GP, Mulholland RC, Worthington BS. Diagnosis of lumbar disc protrusion. *J Bone Joint Surg* 1988; 70-B: 717-722.
- [248] Taguchi T, Ohtsuka A, Murakami T. Light and Electron Microscopic Detection of Anionic Sites in the Rat Choroid Plexus. *Arch Histol Cytol* 1998; 61: 243-252.
- [249] Tata AM, Plateroti M, Cibati M, Biagioni S, Augusti-Tocco G. Cholinergic markers are expressed in developing and mature neurons of chick dorsal root ganglia. *J Neurosci Res* 1994; 37: 247-255.
- [250] Taylor P, Radic Z. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol (United States)* 1994; 34: 281-320.
- [251] Thomas L. Cholinesterasen. In: Thomas L (Hrsg). *Labor und Diagnose*. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH; Frankfurt/Main 1998: 67-73.
- [252] Tibbling G, Link H, Ohman S. Principle of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scan J Clin Lab Invest* 1977; 37: 385-390.
- [253] Tornel PL, Campoy FJ, Vidal CJ. Cholinesterases in cerebrospinal fluid in patients with meningitis and hydrocephaly. *Clin Chim Acta* 1993, 214: 219-225.
- [254] Tornel PL, Saez-Valero J, Vidal CJ. Ricinus communis agglutinin I reacting and non-reacting butyrylcholinesterase in human cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett* 1992; 145: 59-62.
- [255] Tromm A, Hüppe D, Than I, Schwegler U, Kuntz HD, Krieg M, May B. Die Serumcholinesterase als Aktivitätsparameter bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. *Z Gastroenterol* 1992; 30: 449-453.
- [256] Trundle D, Marcial G. Detection of cholinesterase inhibition. The significance of cholinesterase measurements. *Ann Clin Lab Sci* 1988; 18: 345-352.
- [257] Ummenhofer WC, Brown SM, Bernards CM. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase are expressed in the spinal meninges of monkeys and pigs. *Anesthesiology* 1998; 88: 1259-65.

- [258] Urban JPG, McMullin JF. Swelling pressure of the lumbar vertebral discs: influence of age, spinal level, composition, and degeneration. *Spine* 1988; 13: 179-187.
- [259] Urovitz EP, Fornasier VL: Autoimmunity in degenerative disc disease: a histopathologic study. *Clin Orthop* 1979; 142: 215-218.
- [260] van Schayck RH, Weiller C: Behandlung akuter und chronischer Schmerzen in der neurologischen Rehabilitation (Teil 1): Therapie von akuten und chronischen Schmerzen, neuropathischen Schmerzen, Kopfschmerzen, Rückenschmerzen und Tumorschmerzen. *Neurol Rehabil* 2002; 8 (1): 1-17.
- [261] Vanegas H, Schaible HG. Prostaglandins and cyclooxygenases [correction of cyclooxygenases] in the spinal cord. *Prog Neurobiol* 2001; 64: 327-363.
- [262] Vasquez E, Bar KJ, Ebersberger A, Klein B, Vanegas H, Schaible HG. Spinal prostaglandins are involved in the development but not the maintenance of inflammation-induced spinal hyperexcitability. *J Neurosci* 2001; 21: 9001-9008.
- [263] Venkataraman BV, Rani MA, Andrade C, Joseph T. Correlation of time course of blood cholinesterase activity and toxic manifestations of acute methylparation in antidote treated rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 1994; 38: 214-216.
- [264] Vogt M, Smith AD, Fuenmayor LD. Factors influencing the cholinesterases of cerebrospinal fluid in the anaesthetized cat. *Neuroscience* 1984; 12: 979-995.
- [265] Walker DC, MacKenzie A, Hosford S. The structure of the Tricellular Region of Endothelial Tight Junctions of Pulmonary Capillaries Analyzed by Freeze-Fracture. *Microvasc Res* 1994; 48: 259-281.
- [266] Waterlow JC. Liver cholinesterase in malnourished infants. *Lancet* 1950; 258: 908-909.
- [267] Way RC, Flutton CJ, Kutty KM. Relationship between serum cholinesterase and low density lipoprotein in children with nephrotic syndrome. *Clin Biochem* 1975; 8: 103-107.
- [268] Weber H. Lumbar disc herniation: a controlled, prospective study with ten years of observation. *Spine* 1983; 8: 131-140.
- [269] Weber H. The natural history of disc herniation and the influence of intervention. *Spine* 1994; 19: 2234-2238.
- [270] Webster BS, Snook SH. The cost of compensable low back pain. *J Occup Med* 1990; 32: 13-15.
- [271] Weinbaum S, Tsay R, Curry FE. A three-dimensional junction-pore-matrix model for capillary permeability. *Microvasc Res* 1992; 44: 85-111.
- [272] Welch MJ, Markham CH, Jenden DJ. Acetylcholine and choline in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease and Huntington's chorea. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1976; 39: 367-374.
- [273] Wester P, Pun G, Reiz S, Winbland B, Wester PO. Increased monamine metabolite concentrations and cholinesterase activities in cerebrospinal fluid of patients with acute stroke. *Acta Neurol Scand* 1987; 76: 473-479.
- [274] Whittaker M. Cholinesterase in clinical medicine. *Monographs in Human Genetics*. Basel: Karger 1986: 65-81.
- [275] Woodworth GE, Sears DH, Grove TM, Ruff RH, Kosek PS, Katz RL. The effect of cimetidine and ranitidine on the duration of action of succinylcholine. *Anesth Analg* 1989; 68: 295-297.
- [276] Worthington WC, Cathcart RS. Ciliary currents on ependymal surface. *Ann N Y Acad Sci* 1966; 130: 944-950.
- [277] Wright CI, Geula C, Mesulam MM. Neuroglial cholinesterases in the normal brain and in Alzheimer's disease: relationship to plaques, tangles, and patterns of selective vulnerability. *Ann Neuro* 1993; 34: 373-84.
- [278] Yabuki S, Kawaguchi Y, Nordborg C, Kikuchi S, Rydevik B, Olmarker K. Effects of lidocaine on nucleus pulposus-induced nerve root injury. A neurophysiologic and histologic study of the pig cauda equina. *Spine* 1998; 23: 2383-2389.

- [279] Yaksh TL, Dirksen R, Harty GJ. Antinociceptive effects of intrathecally injected cholinomimetic drugs in the rat and cat. *Eur J Pharmacol* 1985;117: 81-8.
- [280] Yamada S, DePasquale M, Patlak CS, Cserr HF. Albumin outflow into deep cervical lymph from different regions of rabbit brain. *Am J Physiol.* 1991; 261: 1197-1204.
- [281] Zenker W, Bankoul S, Braun JS. Morphological indications for considerable diffuse reabsorption of cerebrospinal fluid in spinal meninges particularly in areas of meningeal funnels. An electronmicroscopical study including tracing experiments in rats. *Anat Embryol* 1994; 189: 243-258.
- [282] Zenker W, Stelzig M, Sulzgruber SC, Neumann A. Fiber analysis of human ventral and dorsal roots on the basis of different acetylcholinesterase activity. *Acta Anat (Basel)* 1979; 103: 319-326.

Cholinesterasen in Liquor und Serum - Untersuchungen zur Pathogenese von Krankheitsbildern mit degenerativen Veränderungen der lumbalen Wirbelsäule

Thesen

- (1) Rückenschmerzen haben in den Industrienationen dramatische Ausmaße angenommen. Über 70% aller Erwachsenen leiden mindestens einmal im Leben an Rückenschmerz, 7% haben einmal pro Jahr akute Rückenschmerzen, 3 - 7% leiden unter chronischem Rückenschmerz. Nach van Schayck und Weiller ist die auslösende Ursache von Rückenschmerzen bei 2/3 aller untersuchten Fälle letztlich *unklar*. Offensichtlich stellen degenerative Wirbelsäulenerkrankungen die *zahlenmäßig bedeutendste* somatische Ursache von Rückenschmerzen dar.
- (2) Detaillierte differentialdiagnostische Statistiken über den Anteil der verschleißbedingten Ursachen für den Rückenschmerz sind in den letzten Jahrzehnten *nicht* erarbeitet worden. Es ist jedoch anzunehmen, daß die überwiegende Mehrzahl der Patienten unter degenerativen Veränderungen der Wirbelsäule leidet, da andere Ursachen wie traumatische Schäden des Rückenmarkes mit einer Inzidenz von 1/20000, oder Osteomyelitis der Wirbelkörper mit einer Inzidenz von 1/250000 eher eine untergeordnete Rolle in der Epidemiologie des Rückenschmerzes spielen.
- (3) Während die Inzidenz des Rückenschmerzes unter der Bevölkerung moderner Industriestaaten in den vergangenen Jahren annähernd gleich zu bleiben scheint, nehmen die *Ausgaben* für Verlust an Arbeitszeit, für Therapie und Kompensationen beständig zu.
- (4) Degenerative Veränderungen der lumbalen Wirbelsäule stellen aus funktioneller Sicht eine Einheit nicht voneinander zu trennender pathologischer Erscheinungen dar, die auf den Alterungsprozeß der betroffenen Strukturen zurückzuführen sind. Die klinischen Erscheinungsbilder werden durch ineinander übergehende Phasen mechanischer Alterationen (Dysfunktion, Instabilität, Stabilisierung) bestimmt. Aus diagnostischen (bildgebenden) Erwägungen wird eine Einteilung in

Fassettengelenkarthrosen, Bandscheibenvorfälle und knöcherne Enge des Spinalkanals vorgenommen. Klinische und neurophysiologische Diagnostik ermöglichen eine weitere Einteilung in Schmerzsyndrome (lokal, fortgeleitet, oder radikulär) mit oder ohne neurologische Ausfallserscheinungen (sensibel, motorisch).

- (5) Eine umfassende Erklärung der *Pathogenese* des Schmerzes und neuronaler Schädigungen auf geweblicher und zellulärer Ebene konnte *bisher nicht* gefunden werden. Die Einengung der Strukturen des Wirbelkanals bzw. Kompression der Nervenwurzeln stellt *eine* der bekannten *ätiologischen* Grundlagen des Schmerzes und der Funktionseinschränkung dar.
- (6) Akute und chronische Rücken- und Beinschmerzen im Rahmen degenerativer Wirbelsäulenerkrankungen können als *Nozizeptorschmerzen* durch mechanische Bedrängung und entzündliche Irritation an der Nervenwurzel, in den Wirbelgelenkkapseln und Bandstrukturen auftreten. Diese führen zu reflektorischen, ebenfalls potentiell schmerzauslösenden Reaktionen der Muskulatur. Bei pseudoradikulären Schmerzen im Rahmen von Gelenkblockierungen werden häufig *übertragene* Schmerzen beobachtet. Läsionen des Myelons, mechanische und entzündliche Nervenwurzelschädigungen und periphere Nervenläsionen führen zum *neuropathischen* Schmerz einschließlich radikulärer Schmerzsyndrome.
- (7) Die Therapie ist von *operativer* Seite auf die Beseitigung von Instabilität und Kompression ausgerichtet. Der größte Teil der degenerativen Wirbelsäulenschäden rechtfertigt jedoch *nicht* den operativen Eingriff und wird *konservativ* behandelt. Langzeitstudien zeigten, daß die operative der konservativen Therapie bei nachgewiesenen Bandscheibenschäden nur im ersten Jahr nach dem Eingriff überlegen ist.
- (8) Die *konservative* Therapie ist häufig empirisch orientiert. Dem behandelnden Arzt fällt es oft nicht leicht, herauszufinden, welche der therapeutischen Maßnahmen zu positivem Behandlungsergebnis führen. Entlastung mechanischer Kompression der Dura bzw. nervaler Strukturen durch medikamentöse (analgetisch-antientzündlich) und physiotherapeutische Behandlung wird zwar angenommen, läßt sich aber durch bildgebende oder elektrophysiologische Verfahren *nicht* beweisen.
- (9) Chronischer lokaler lumbaler Schmerz, Lumboischialgie oder Wurzelreizsyndrom, assoziiert mit *Fassettengelenkarthrose* oder engem *knöchernen Spinalkanal*, können erfolgreich durch konservative Maßnahmen therapiert werden. Der

Behandlungserfolg ist offensichtlich *nicht* durch verminderte knöcherne Einengung zu erklären. Der These mechanisch ausgelöster Kompression folgend, bewirken systemische antientzündlich-medikamentöse Therapie wie auch physiotherapeutische Anwendungen ein Abschwellen der betroffenen meningealen, nervalen und bindegewebigen Strukturen im Bereich der Läsion.

- (10) Umflutungen der durch degenerative Veränderungen betroffenen Region mit Lokalanästhetika haben einen sofortigen *antinozizeptiven* Effekt durch Unterbrechung der Schmerzleitung. Bandscheibenvorwölbungen oder knöcherne Enge werden durch die lokale Applikation von schmerzstillenden/antientzündlichen Medikamenten *nicht* kausal beeinflusst.
- (11) Für die über die initiale Anästhesie hinausgehende Wirkung lokal applizierter Medikamente im Bereich der Wirbelsäule konnte bisher *keine* überzeugende Erklärung gefunden werden. Wechselnde Therapieerfolge legen die Vermutung nahe, daß mechanische Entlastung *nicht ausschließlich* als Erklärung für das gebesserte Schmerzbild gelten kann. Funktionelle Veränderungen der physiologisch-biochemischen Eigenschaften betroffener Gewebe sind anzunehmen. Die Frage nach der schmerzauslösenden Pathologie läßt sich offenbar nur über einen *neuen* methodischen Zugang zu den lokal betroffenen Geweben bzw. zu ihren funktionellen Eigenschaften klären.
- (12) Eine bioptische Entnahme der durch degenerative Wirbelsäulenerkrankungen geschädigten meningealen und neuronalen Gewebe ist beim Menschen verständlicherweise nicht durchführbar. Studien zur Ätiopathogenese basierten deshalb vorrangig auf den Ergebnissen histologischer Untersuchungen exzidiierter Bandscheiben, Wirbelgelenke und ligamentärer Strukturen bei dekomprimierenden Wirbelsäuleneingriffen sowie auf post mortem Analysen.
- (13) Eine indirekte Untersuchungsmethode ergibt sich durch die im Rahmen der Diagnostik vorgenommenen bildgebenden Verfahren. Die Computertomographie hat die Möglichkeiten der Grundlagenforschung bei Wirbelsäulenerkrankungen revolutioniert. Die hoch auflösenden Bilder magnetresonanztomographischer Untersuchungen ermöglichen eine anderen Darstellungsformen überlegene Weichteildiagnostik bei degenerativen Bandscheiben- und Wirbelgelenkschäden. Studien weisen jedoch auf die Schwierigkeiten bei der Zuordnung von bildgebenden Darstellungen im Zusammenhang mit Rückenproblemen hin: Selbst qualitativ

hochwertige Magnetresonanztomogramme erlauben *keine absolut sicheren* Rückschlüsse auf die zugrunde liegende Ätiopathogenese der schmerzhaften spinalen Funktionsminderung.

- (14) Keine Untersuchungsmethode ist perfekt. Moderne technische Verfahren stellen eine Vielzahl von pathologischen Veränderungen dar. Die entscheidende Frage ist jedoch, *welche* dieser Veränderungen für die Symptome des Patienten ätiologisch verantwortlich zu machen sind und durch welche *pathogenetischen* Mechanismen die Symptomatik ausgelöst wird. Diese Problematik kann nicht nur durch qualitative Verbesserung der erwähnten Untersuchungstechniken geklärt werden, sondern erfordert ebenfalls andere Untersuchungsansätze. Als ein solcher bieten sich *relevante Parameter des Liquor cerebrospinalis* an. Liquorproben werden bei Myelographien und Spinalanästhesien methodisch bedingt entnommen und stehen der Forschung ohne zusätzliche Belastung des Patienten zur Verfügung.
- (15) Der Wert liquoranalytischer Studien für die ätiologisch-pathogenetische Aufklärung von Erkrankungen des Nervensystems ergibt sich aus der für den Stofftransport *fehlenden morphologischen* Schranke zwischen Extrazellularraum von Gehirn, Rückenmark bzw. Nervenwurzeln und den Liquorräumen. Der *lumbale* Liquor erscheint wegen der im Lumbalraum eingeschränkten Liquorzirkulation für die Untersuchung funktioneller Eigenschaften der umgebenden Gewebe besonders geeignet.
- (16) Der im ventrikulären Kompartiment über den Plexus chorioideus ultrafiltrierte Liquor liefert Informationen über die primäre Zusammensetzung, welche im gesamten Liquorraum modifiziert und erweitert wird. Der *ventrikuläre* Liquor könnte folglich als eine Art Referenzflüssigkeit für Untersuchungen des lumbalen Liquors dienen und Auskünfte über einen anzunehmenden *ventriculo-lumbalen Gradienten* von zu untersuchenden Parametern liefern.
- (17) Der Zufluß von aus nervalen und meningealen Strukturen extrazellulär freigesetzten Proteinen läßt den Liquor cerebrospinalis zum Spiegel *sekretorischer Aktivität der Ursprungsgewebe* werden. Diese ist ein Maß für den *funktionellen* Zustand der die Proteine freisetzenden Gewebe. Andererseits ist der Gehalt an Eiweißen, die ausschließlich aus dem Blut in den Liquor gelangen, eine wichtige Informationsquelle über den *funktionellen Zustand der Blut-Liquor-Schranke*.

- (18) Die *Hirn/Rückenmark-Liquor-Schranke* ist unter *physiologischen* Bedingungen für nicht-sekretorische intrazelluläre Proteine *dicht*, da die Zellmembranen einen transzellulären Transport verhindern. Proteine allerdings, die intrazellulär gebildet und an die Membranaußenseite sezerniert werden, sowie dort funktionell aktiv sind, werden unter normalen Bedingungen im Rahmen ihrer biologischen Lebensdauer in entsprechend geringen, unter Schädigungsbedingungen aber in höheren Konzentrationen über den Extrazellularraum in das damit frei kommunizierende Liquorkompartiment abgegeben. Solche Proteine können somit als *Markerproteine* für die funktionelle Aktivität ihrer zellulären Herkunftsorte dienen. Als Herkunftsorte kommen Zellpopulationen des Hirnparenchyms, des Myelons, der Nervenwurzeln und der Meningen in Frage.
- (19) Die *Acetylcholinesterase* (AChE) bietet sich als ein funktionsbezogener Parameter für die Untersuchung der *Hirn/Rückenmark-Liquor-Sekretion* an. Parallele Untersuchungen des Albuminquotienten Liquor/Serum bzw. der AChE-Aktivität im Liquor könnten Zusammenhänge zwischen alterierter Funktion der Blut-Liquor-Schranke und der Hirn/Rückenmark-Liquor-Sekretion aufzeigen.
- (20) Die *Butyrylcholinesterase* (BChE) kann ebenfalls als Markerprotein für die *Hirn/Rückenmark-Liquor-Sekretion* verwendet werden. Das Enzym tritt jedoch auch aus dem Blut in den Liquorraum ein. Der *BChE-Quotient Liquor/Serum* ist wegen des hohen Aktivitätsgefälles vom Serum zum Liquor als zusätzlicher Parameter der *Blut-Liquor-Schrankenfunktion* verwertbar.
- (21) Als *Arbeitshypothese* der vorliegenden Studien wurde daher formuliert, daß aus Aktivitäts- bzw. Konzentrationsänderungen der AChE, BChE, des Albumins und Gesamteiweißes in Liquor und Serum *zusätzliche* Informationen zur Pathogenese von Schmerz und Funktionsminderung bei degenerativen lumbalen Wirbelsäulenerkrankungen gewonnen werden können. *Verlaufsuntersuchungen* dieser Parameter unter therapeutischen Bedingungen (operative Eingriffe, Spinalanästhesie, rückenmarksnahe Infiltrationen) sollten weitere Einsichten vermitteln.

- (22) Das *Ziel* der vorliegenden Arbeit war es, zu analysieren, ob eine durch degenerative Veränderungen der Lendenwirbelsäule verursachte Alteration neuraler Strukturen und/oder der Meningen signifikante Veränderungen der arbeitshypothetisch als funktionsrelevant prognostizierten Liquorparameter induziert.
- (23) *Zusätzlich* erforderliche Zielstellungen waren: a) Entwicklung zuverlässiger Bestimmungsverfahren und Feststellung entsprechender Referenzwerte der AChE- und BChE-Aktivitäten im lumbalen Liquor, b) Untersuchung des Einflusses methodischer Störeffekte (Einfluß von Medikamenten auf die Testsysteme zur Bestimmung der Cholinesteraseaktivitäten), c) Vergleichende Untersuchungen ventrikulärer Liquores zur Beurteilung ventriculo-lumbaler Aktivitätsgradienten der Cholinesterasen, d) Untersuchung des Einflusses operativer Eingriffe und der Applikation des Lokalanästhetikums Bupivacain auf die analysierten Liquorparameter.
- (24) Nach laboranalytischen Kriterien normale Liquor- und Serumproben von klinisch gesunden Personen wurden als Kontrollen herangezogen. Entsprechend der spezifischen Fragestellungen wurden Patienten mit symptomatischen degenerativen Veränderungen der Lendenwirbelsäule und neurochirurgische Patienten (ventrikuläre Liquores) untersucht.
- (25) *Analysierte Parameter:* AChE- und BChE-Aktivitäten im Liquor, Serum-BChE-Aktivität, Gesamteiweißkonzentration des Liquors, Konzentrationen des Albumins in Liquor und Serum, Albuminquotient Liquor/Serum, Leukozytenzahl und Differentialzellbild im Liquor, Liquor/Serum-Quotienten von IgG, IgA und IgM.
- (26) Der *Referenzbereich der Acetylcholinesteraseaktivität* im lumbalen Liquor betrug 9,2 bis 24,4 nmol/min x ml.
- (27) Die *Mehrzahl* der in ventrikulären Liquorproben neurochirurgischer Patienten ermittelten AChE-Aktivitäten lag in einem Bereich bis 4 nmol/min x ml. Unter physiologischen Bedingungen ist damit ein *ventriculo-lumbaler* AChE-Aktivitätsgradient von ca. 1 : 3 anzunehmen.
- (28) Der *Referenzbereich der Butyrylcholinesteraseaktivität* im lumbalen Liquor lag zwischen 5,4 und 17,0 nmol/min x ml.
- (29) Regressionsanalysen ergaben, daß sich die BChE-Aktivität im normalen lumbalen Liquor in erster Linie aus der Enzymsekretion durch Zellen *nervaler* Herkunft

rekrutiert. Der Enzymeinstrom über die Blut-Liquor-Schranke spielt unter physiologischen Bedingungen eine untergeordnete Rolle.

- (30) Die Mehrzahl der *ventrikulären* Liquorproben des neurochirurgischen Patientengutes zeigte BChE-Aktivitäten bis 6 nmol/min x ml. Im Mittel aller untersuchten ventrikulären Liquorproben überwog die Ultrafiltration des Enzyms durch die Blut-Liquor-Schranke gegenüber der zellulären Sekretion aus dem Nervensystem. Ein *ventriculo-lumbaler* BChE-Aktivitätsgradient von ca. 1 : 2 ist unter normalen Bedingungen zu erwarten.
- (31) Ein Einfluß eventuell vorhandener Medikamente (infolge therapeutischen Einsatzes) auf die AChE- und BChE-Aktivitäten von normalen Liquor- bzw. Serumproben konnte *ausgeschlossen* werden.
- (32) *AChE-Aktivität bei degenerativen Veränderungen der Lendenwirbelsäule:*
Die AChE-Aktivität war bei Patienten *mit neurologischen* Defiziten signifikant gesteigert. Magnetresonanztomografisch diagnostizierte *laterale* Engpässe führten zu einer signifikanten Erhöhung der AChE-Aktivität. Mediale Engpässe bedingten eine Erhöhung der AChE-Aktivität, jedoch war diese nicht signifikant.
- (33) Die gesteigerte AChE-Sekretion in den Liquor bei schmerzhaft degenerativen Lendenwirbelsäulenschäden sind als Zeichen funktioneller Stimulation *vitaler* neuronaler Zellen der Nervenwurzeln durch mechanische und dem degenerierten Bandscheibengewebe entstammende chemische Noxen zu werten. Ein zusätzlicher endoneuraler Entzündungsmechanismus kann nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin ist ein Zusammenhang der erhöhten AChE-Sekretion mit Substanz P im Sinne der Hydrolyse dieses schmerzassoziiert freigesetzten Mediators denkbar. Die erhöhte neuronale AChE-Sekretion steht somit offensichtlich *nicht* mit der Funktion des Enzyms in cholinergen Transmissionssystemen in Verbindung.
- (34) Signifikante Erhöhungen der *BChE-Aktivität, der Gesamteiweißkonzentration im Liquor bzw. des Liquor/Serum-Albuminquotienten* fanden sich bei Patienten mit symptomatischen degenerativen Schäden der Lendenwirbelsäule *unabhängig* vom neurologischen Status bzw. von der Lokalisation des Engpasses. Hinsichtlich der Erhöhung aller untersuchten Liquorparameter waren keine signifikanten Unterschiede zwischen akuten und chronischen Krankheitsbildern festzustellen.
- (35) Die *BChE-Aktivität* des lumbalen Liquors wird normalerweise hauptsächlich von der neuronalen Sekretion bestimmt, unter den untersuchten *pathologischen* Bedingungen

findet sich jedoch auch ein verstärkter Einstrom aus dem Blut. Die beobachtete Erhöhung der BChE-Aktivität im Liquor bei degenerativen Lendenwirbelsäulenschäden kann als Indiz sowohl für die Aktivierung neuronaler sekretorischer Aktivität, *als auch* für einen lokalen Defekt der Blut-Liquor-Schrankenfunktion gewertet werden.

- (36) Erhöhte *Liquor/Serum-Albuminquotienten* und *Gesamteiweißkonzentrationen* im Liquor bestätigten die Schrankenfunktionsstörung, welche wahrscheinlich durch neurogene Entzündung duraler Gefäße und/oder direkte endoneurale vaskuläre Permeabilitätssteigerung nach Zustrom von Entzündungsmediatoren aus epiduralen Gefäßen ausgelöst wurde.
- (37) *Einfluß von Bupivacain auf AChE-Aktivitäten* im lumbalen Liquor: Signifikante Korrelationen zwischen Bupivacaindosierungen und Parameterveränderungen bestanden nicht. Erniedrigte AChE-Aktivitäten im Liquor von unter spinaler Bupivacainanästhesie operierten Patienten konnte *nicht* auf den Einfluß des Lokalanästhetikums zurückgeführt werden, da nach intrathekaler Bupivacaingabe *ohne* nachfolgende Operation die AChE-Aktivität des Liquors *unverändert* blieb. Es ist anzunehmen, daß Bupivacain die sekretorische Aktivität der AChE-sezernierenden Zellen des Nervensystems *nicht hemmt*. Eine direkte Hemmung der AChE-Aktivität auf molekularer Basis durch Bupivacaingehalte in den untersuchten Liquorproben ist nicht wahrscheinlich.
- (38) *Einfluß von Bupivacain auf BChE-Aktivitäten und Albuminquotienten*: Operative Eingriffe unter spinaler Anästhesie mit Bupivacain induzierten signifikant *erniedrigte* Serum- und Liquoraktivitäten der BChE, während Spinalanästhesie mit Bupivacain *ohne* Operation *keine* derartigen Veränderungen hervorrief. Die Serum-BChE-Aktivität blieb nach *periartikulären Infiltrationen* der lumbosakralen Wirbelgelenke *unbeeinflusst*, während ein operativer Eingriff unter Allgemeinnarkose eine erniedrigte Serum-BChE-Aktivität verursachte. Der Albuminquotient Liquor/Serum war nach intrathekaler Gabe von Bupivacain generell *unverändert*.
- (39) Erniedrigte Cholinesteraseaktivitäten, Albuminquotienten und Gesamteiweißkonzentrationen nach operativer Intervention sind *nicht* auf die Wirkung des parallel applizierten Medikamentes *Bupivacain* zurückzuführen. In Bezug auf die untersuchten Parameter bewirkten paravertebrale und intrathekale

Bupivacainapplikation *keine* Änderung der neuronalen sekretorischen Aktivität bzw. der Funktion der Blut-Liquor-Schranke.

- (40) Eine hypothetische Erklärung für den über die Wirkungsdauer von Lokalanästhetika hinausgehenden schmerzlindernden Effekt ist die Unterbrechung nozizeptiv ausgelöster neurogener Entzündungsmechanismen duraler Gefäße. Auch die Hyperexzitabilität der Hinterhornneuronen (zentrale Sensibilisierung) könnte durch die Wirkung eines Lokalanästhetikums langfristig vermindert sein, wodurch Hyperalgesie und Schmerzausbreitung in ihrem Ausmaß eingeschränkt würden.
- (41) Meningitische Reaktionen auf Lumbalpunktionen mit oder ohne Anlage von intrathekalen Kathetern konnten ausgeschlossen werden. Intrathekale Immunglobulinsynthesen wurden nicht diagnostiziert.
- (42) Zur Verbesserung der Methodik wurde ein *erster Inhibitor-freier Test* zur parallelen Bestimmung von AChE- und BChE-Aktivitäten im Liquor entwickelt, der ohne die bisher verwendeten hoch-toxischen Inhibitoren arbeitet. Desweiteren konnte aufgrund der in vitro-Teste mit Bupivacain eine Analysetechnik zur AChE-Bestimmung entwickelt werden, bei der die im Liquor parallel vorhandene BChE durch Bupivacain-Testendkonzentrationen zwischen 0,1 und 0,5 mmol/l weitgehend selektiv gehemmt wird. Dieser *Bupivacain-Hemmtest* kommt somit ebenfalls ohne toxische Inhibitoren aus. Beide neuentwickelten Testverfahren gestatten eine breite Anwendung bei Körperflüssigkeiten, in denen beide Cholinesterasen parallel vorkommen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, daß mir die Habilitationsordnung der Friedrich-Schiller-Universität Jena vom 07.01.1997 bekannt ist. Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

- Durchführung der klinischen Studien: *Herr DM A.Gerhardt, Herr Dr.A.Hochstetter, Frau DM U.König, Frau Dr.M.Lange*
- Anleitung in labortechnischen Verfahren und bei in vitro Versuchen: *Herr Dr.W.Hartmann, Herr Prof.H.Kluge*
- Anwendung statistischer Verfahren: *Herr Dr.R.Vollandt*
- Hinweise zur Erstellung von Publikationen, Manuskriptkorrekturen: *Frau Dr.H.Bauer, Herr Prof.V.Bigl, Herr Prof.V.Ewerbeck, Herr Prof.H.Kluge, Herr Prof.J.Mollenhauer, Herr Prof.H.-G.Schaible, Herr Dr.F.Seidel, Herr PD O.Sölch, Herr Prof.R.Venbrocks, Herr Prof.O.Witte*

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich erkläre, daß ich nicht an anderer Stelle ein Habilitationsverfahren für das Fachgebiet Orthopädie beantragt habe oder erfolglos beendet habe.

Ich versichere, daß ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Jena, den 31.10.2002

Unterschrift

Danksagung

Für die Unterstützung bei Forschung, Publikationen und Manuskripterstellung zur vorliegenden Arbeit möchte ich mich bedanken bei:

Frau Dr.H.Bauer, Herrn Prof.V.Bigl, Herrn Prof.V.Ewerbeck, Herrn DM A.Gerhardt, Herrn Dr.W.Hartmann, Herrn Dr.A.Hochstetter, Herrn Prof.H.Kluge, Frau DM U.König, Frau Dr.M.Lange, Herrn Prof.J.Mollenhauer, Herrn Prof.H.-G.Schaible, Herrn Dr.F.Seidel, Herrn PD O.Sölch, Herrn Prof.R.Venbrocks, Herrn Dr.R.Vollandt und bei Herrn Prof.O.Witte.

Wolfram Kluge